

Aus der Klinik für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie
(Direktor: Prof. Dr. Dr. J. Wiltfang)
im Universitätsklinikum Schleswig-Holstein Campus Kiel
an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

**SINUSBODENAUGMENTATION MIT SIMULTANER
IMPLANTATINSERTION AM GÖTTINGER MINISCHWEIN DURCH
TISSUE ENGINEERING – IN-VITRO PRÄFABRIKATION VON
AUTOLOGEN KNOCHENTRANSPLANTATEN DURCH
DREIDIMENSIONALE OSTEOLASTENKULTUREN, XENOGENES
KNOCHENMATERIAL UND PLÄTTCHENREICHES PLASMA**

Inauguraldissertation
zur
Erlangung der Würde eines Doktors der Zahnheilkunde
der Medizinischen Fakultät
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von
Johannes Voß
aus Lübeck

Kiel 2009

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Dr. Terheyden

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Dörfer

Tag der mündlichen Prüfung: 20.04.2010

Zum Druck genehmigt, Kiel, den 20.04.2010

gez.: Prof. Dr. Dr. I. Cascorbi
(Vorsitzender des Ausschusses für Promotion)

Meiner Mutter

INHALTSVERZEICHNIS

1. EINLEITUNG	1
1.1 Einführung.....	1
1.2 Sinusbodenaugmentation (Sinuslift).....	2
1.3 Knochenersatzmaterialien.....	3
1.4 Das plättchenreiche Plasma (PRP) und seine Wachstumsfaktoren.....	5
1.5 Tissue Engineering	6
1.6 Fragestellung	7
2. MATERIAL UND METHODE	8
2.1 Auswahl der Versuchstiere und Tierhaltung.....	8
2.2 Versuchsaufbau und Zielgrößen	8
2.3 Verwendetes Knochenersatzmaterial.....	9
2.4 Verwendete Dentalimplantate	10
2.5 Herstellung des plättchenreichen Plasmas (PRP)	10
2.6 Anästhesie und Medikation	11
2.7 Knochenentnahmen	12
2.8 Herstellung der Zellkultur	12
2.9 Inkubation von Bio-Oss® mit autologen Osteoblasten.....	13
2.10 Sinusbodenaugmentation mit extraoralem Zugang.....	13
2.11 Intravitale polychrome Sequenzmarkierung	16
2.12 Intraversale Perfusion	17
2.13 Herstellen der Präparate	19
2.13.1 Vorbereitung und Fixierung der Präparate	19
2.13.2 Entwässerung und Einbetten der Präparate.....	19
2.13.3 Herstellung der unentkalkten Hartschliffpräparate.....	22
2.14 Mikroradiographie	24
2.15 Fluoreszenzmikroskopie	25
2.16 Toluidinblaufärbung.....	26
2.17 Histomorphometrie.....	27
2.18 Statistische Auswertung.....	28
3. ERGEBNISSE	29
3.1 Klinik	29
3.2 In-vitro Bestimmung von Zellen auf Bio-Oss®	29

3.3 Zählung der Thrombozyten im Vollblut und plättchenreichen Plasma.....	30
3.4 Mikroradiographie	31
3.5 Fluoreszenzmikroskopie	33
3.6 Toluidinblaufärbung.....	34
3.7 Histomorphometrie.....	38
3.7.1 Knochen-Implantat-Kontakt (BIC).....	38
3.7.2 Augmentationshöhe.....	39
3.7.3 Knochendichte im Augmentat.....	40
4. DISKUSSION	41
4.1 Bewertung des plättchenreichen Plasmas	42
4.2 Bewertung der autologen Osteoblasten	43
4.3 Osseointegration der Implantate	46
4.4 Schlussfolgerung.....	47
5. ZUSAMMENFASSUNG	48
6. LITERATURVERZEICHNIS	49
7. ANHANG	58
8. DANKSAGUNG	62
9. LEBENSLAUF	63

1. EINLEITUNG

1.1 Einführung

Nach Zahnverlust kommt es im menschlichen Kiefer schon nach kurzer Zeit zur Resorption des Alveolarkammes (Hirschfeld & Wasserman 1978). Dabei beträgt die durchschnittliche Resorption des Oberkiefers ein Viertel der Resorption des Unterkiefers (Tallgren 1972). Dieser Vorgang ist progressiv und irreversibel. Andererseits gewinnt ein festsitzender und ästhetisch hochwertiger Zahnersatz in der modernen Zahnheilkunde immer mehr an Bedeutung. Dies ist bei einer Freundsituation mit implantatgetragenen Zahnersatz oder mit Extensionsbrücken möglich. Hier besteht jedoch nur die Möglichkeit, einen Prämolaren anzuhängen und diese weisen eine verhältnismäßig schlechtere Langzeitprognose auf (Karlsson 1989, Strub et al. 1989). Dem gegenüber stehen hohe Überlebensraten von implantatgetragenen Suprakonstruktionen (Buser et al. 1999, Behneke et al. 2002). Im distalen Oberkiefer gilt die Prognose für Implantate jedoch erst ab einem Knochenangebot von 10 mm als gut (Schliephake et al. 1997).

Die Sinusbodenaugmentation ist bei einem zu geringen Knochenangebot das Mittel der Wahl, um eine ausreichende Knochendicke zu schaffen und somit eine stabile Insertion des Implantats zu gewährleisten. Die Augmentation mit intra- oder extraoralem autologem Knochen ist heute ein etabliertes Verfahren (Kübler et al. 1999, Lundgren et al. 1999, Raghoobar et al. 2001). Aufgrund der begrenzten Verfügbarkeit und der erhöhten Spendermorbidity nach der Entnahme aus der Spenderregion (Kübler et al. 1999) wird der Ersatz dieser Knochentransplantate angestrebt (Lundgren et al. 1996). Für die Knochenheilung sind neben einer Matrix Osteoblasten bzw. Osteoblastenprogenitorzellen und Wachstumsfaktoren notwendig (Lynch et al. 1999).

Als Matrix dienen zum Beispiel anorganische Knochenersatzmaterialien bovinen Ursprungs und Hydroxylapatite, welche klinisch erprobt sind und osteokonduktiv wirken (Artzi et al. 2002, Haas et al. 2002). Nachteil ist eine lange Einheilphase von 6 bis 9 Monaten (Tatum 1986, Moy et al. 1993) und eine Inhomogenität des Augmentates aufgrund der langsamen Einwanderung von Osteoblasten und

Gefäßen aus der Kieferhöhlenwand im Gegensatz zu autologen Transplantaten (Terheyden et al. 1999). Diese Einheilphase versucht man durch die Zugabe von Wachstumsfaktoren zu beschleunigen. Zu diesem Zwecke appliziert man unter anderem plättchenreiches Plasma (PRP) aus Eigenblut, in dem Thrombozyten und somit auch Wachstumsfaktoren angereichert sind, wie z.B. BMP's. So soll die Osseointegration der Implantate durch die osteoinduktive Wirkung dieser Faktoren gefördert werden (Marx et al. 1998, Terheyden et al. 1999, Roldan et al. 2004b, Wiltfang et al. 2004). Da die angrenzende Knochenwand der einzige Ursprung der Zellen und das Knochenersatzmaterial zellfrei sind, können diese Faktoren das Knochenwachstum nur bis zu einem bestimmten Grad fördern. Das Mischen von autologem Knochen und Knochenersatzmaterial fördert zwar durch die vorhandenen Zellen das Knochenwachstum und die Osseointegration (Hürzeler et al. 1997b), birgt aber erneut das Problem einer zweiten Operation wie bei autologen Transplantaten. In-vitro durch Zellkultur präfabrizierte (Tissue Engineering) Osteoblastenprogenitorzellen, die auf ein Knochenersatzmaterial angesiedelt werden (Acil et al. 2000), scheinen eine viel versprechende Methode zu sein. Für die Osteoblastenkultur ist nur eine sehr geringe Menge von autologem Knochen nötig.

Bisher gibt es keine experimentelle Tierstudie, in der die Wirkung von mit Osteoblastenvorläuferzellen besiedeltem xenogenem Knochenersatzmaterial und PRP auf die Knochenheilung und Osseointegration von Implantaten nach Sinusbodenaugmentation untersucht wurde.

1.2 Sinusbodenaugmentation (Sinuslift)

Das operative Vorgehen der Sinusbodenaugmentation mit autologem Knochen zur Verbesserung des Knochenangebotes im distalen Bereich der Maxilla wurde 1980 erstmal von Boyne und James beschrieben (Boyne & James 1980) und ist heute ein etabliertes Verfahren (Blomqvist et al. 1996, Lorenzetti et al. 1998).

Die Sinusbodenaugmentation ist indiziert bei einer geplanten Implantatinserterion und einer Knochenhöhe des Alveolarkammes unter 8-10 mm (Triplett & Schow 1996). Der operative Eingriff erfolgt intraoral durch laterale Osteotomie der fazialen Kieferhöhlenwand. Die Kieferhöhlenschleimhaut wird ohne Perforation nach kranial verdrängt und anschließend in den Raum zwischen Kieferhöhlenwand und

Schleimhaut das Augmentationsmaterial eingebracht. Die Erfolgsrate zeigt keinen Unterschied zwischen einer Implantation in ortsständigem Knochen und einer Implantation im autologen Augmentat (Hürzeler et al. 1996). Viel entscheidender ist die Primärstabilität des Implantates (Tidwell et al. 1992, Triplett & Schow 1996).

Als Augmentationsmaterial bieten sich verschiedene Materialien an. Neben autologen Transplantaten bei denen die Morbidität der Spenderregion zu beachten ist, finden Knochenersatzmaterialien immer mehr Verwendung (siehe 1.3 Knochenersatzmaterialien). Sie können einzeln oder in Kombination verwendet werden und führen zu einer Optimierung der Knochenheilung (Kim et al. 2008). Die Kombination von autologem Knochen und Ersatzmaterialien beschleunigt die Knochenheilung und führt zu einer Optimierung der Osseointegration (Hürzeler et al. 1997b, Lorenzetti et al. 1998, Yildirim et al. 2001).

1.3 Knochenersatzmaterialien

Knochenersatzmaterialien sollten biokompatibel, resorbierbar bzw. abbaubar, steril und einfach anwendbar sein (Winn et al. 1999). Sie können osteokonduktiv wirken, das heißt sie dienen als „Leitschiene“, oder osteoinduktiv, sie induzieren also selbst den Knochenneubau. Verwendung zur Heilung von Knochendefekten finden autologe, allogene, xenogene und alloplastische Materialien. Dabei fehlen allen Materialien, außer den frischen autologen Transplantaten, die für die Osteogenese wichtigen Zellen (Nasr et al. 1999), was zu einer verlangsamten Knochenheilung führt (Degidi et al. 2006).

Autologes Knochenmaterial stammt vom gleichen Individuum und kann entweder intraoral aus dem Tuber maxillae, der Linea obliqua, der Kinnregion (Hirsch & Ericsson 1991) oder bei größeren Defekten aus dem Beckenkamm (Boyne & James 1980, Tatum 1986) gewonnen werden. Es wirkt osteoinduktiv; Kieferknochen zeigt eine geringere Resorption als Beckenknochen (Raghoobar et al. 1997). Aufgrund der Morbidität der Spenderregion (Kübler et al. 1999), in der es zu Schmerzen, Wundheilungsstörungen, Narben, Blutungen, Sensibilitätsstörungen und Frakturen kommen kann, ist es wichtig, alternative Ersatzmaterialien zu finden, die unbegrenzt verfügbar sind (van den Bergh et al. 2000, Nkenke et al. 2004).

Allogenes Material stammt von einem Individuum der gleichen Spezies. Es wird aus Leichenknochen gewonnen, wirkt osteokonduktiv und in einem gewissen Maße auch osteoinduktiv (Kübler et al. 1993), da natürliche Proteine enthalten sind (z.B. DFDBA (demineralized freeze-dried bone allograft), GraftonTM (demineralized bone matrix gel)). Im Vergleich zu xenogenen Materialien kommt es so schneller zu einer Osteointegration (Froum et al. 2006). Die Konservierung des Knochens schützt jedoch nicht vor der Transmission von HIV und Hepatitis-C (Cook et al. 1995). Daher ist die Verwendung dieser Materialien umstritten und sollte genau abgewogen werden.

Xenogenes Material stammt von Individuen einer anderen Spezies, ist also natürlichen Ursprungs. Diese porösen Hydroxylapatite werden aus tierischem Knochen hergestellt, können aber auch pflanzlichen Ursprungs sein (z.B. Algipore[®] aus Algen). Der bekannteste Vertreter ist Bio-Oss[®], welches aus Rinderknochen hergestellt wird (boviner Ursprung). Nach chemischer und thermischer Behandlung bleibt allein die antigenfreie anorganischen Matrix übrig (Paul et al. 1993), deren Eigenschaften denen menschlichen Knochens sehr ähnlich sind. Bio-Oss[®] bildet ein Leitgerüst für die von der knöchernen Wand einwandernden Osteoblasten (osteokonduktiv). Klinische (Valentini et al. 1998, Piattelli et al. 1999) und tierexperimentelle Studien (Wetzel et al. 1995, Hürzeler et al. 1997a, Terheyden et al. 1999) zeigen, dass die Sinusbodenaugmentation mit Bio-Oss[®] eine erfolgreiche Methode ist.

Alloplastische Materialien werden synthetisch hergestellt. Zu ihnen gehören Sinterkeramiken wie Hydroxylapatit und Tricalciumphosphat. Aufgrund des langsamen Abbaus im Körper und der relativ schlechten Vaskularisierung ist ihre Indikation eingeschränkt. Vorteilhaft scheint die erhöhte Affinität von Wachstumsfaktoren zu diesen keramischen Materialien zu sein (Hotz & Herr 1994). Das β -Tricalciumphosphat CerasorbTM verfügt seit 2000 über eine Zertifizierung für die Kombination mit autologem, plättchenreichem Plasma (PRP), welches körpereigene Wachstumsfaktoren enthält.

1.4 Das plättchenreiche Plasma (PRP) und seine Wachstumsfaktoren

Das Verfahren zur Herstellung des PRPs basiert auf der Plasmapherese und stammt ursprünglich aus der Transfusionsmedizin. Durch Zentrifugation von autologem Blut und Abschöpfen des Plasmas kommt es zu einer Thrombozytenkonzentration. Das entstandene thrombozyten- bzw. plättchenreiche Plasma wird bei Thrombozytopenien, aplastischen Anämie und Funktionsstörungen der Thrombozyten zur Steigerung der Blutgerinnung (Nanu et al. 1980) und nach chirurgischem Blutverlust (Stover et al. 2000) angewendet.

Marx und Mitarbeiter beschrieben 1998 erstmals die lokale Anwendung von PRP in der Kieferchirurgie zur Optimierung der Einheilung von Knochentransplantaten (Marx et al. 1998). Die Wirkungsweise beruht auf dem in den angereicherten Thrombozyten enthaltenen hohen Gehalt an Wachstumsfaktoren und Zytokinen, wie z.B. Platelet-Derived Growth Factors (PDGF), Transforming Growth Factors- β (TGF β) und Insulin-Like Growth Factor (IGF). Sie wurde 1971 erstmals durch Balk beschrieben (Balk 1971). Durch physiologische oder künstlich hervorgerufene Thrombozytenaktivierung werden diese Faktoren freigesetzt und wirken chemotaxisch sowie direkt und indirekt gewebsregenerativ und proliferativ (Miyazono & Takaku 1989). Eine künstliche Aktivierung erfolgt mittels Thrombin, welches z.B. in Fibrinkleber enthalten ist (Whitman et al. 1997). Das so entstandene „platelet gel“ scheint die Knochenheilung und die Osseointegration der Implantate im Vergleich zu PRP zu beschleunigen (Zhu et al. 2006, Lee et al. 2007, You et al. 2007). Damit wäre eine schnellere Implantatbelastung und somit die prothetische Rehabilitation des Patienten möglich. Dies zeigen tierexperimentelle und klinische Studien. Eine Beschleunigung des Knochenwachstums ist im angrenzenden ortsständigen Knochen und in autologen Knochentransplantaten zu beobachten (Marx et al. 1998, Fennis et al. 2002, Roldan et al. 2004a, Wiltfang et al. 2004). In weiteren Studien, in denen xenogenes oder alloplastisches zellfreies Knochenersatzmaterial verwendet wurde, zeigte sich nur teilweise eine Verbesserung der Knochenheilung (Furst et al. 2003, Wiltfang et al. 2003), zu einer Durchwachsung des Ersatzmaterials kommt es vornehmlich im angrenzenden ortsständigen Knochen (Roldan et al. 2004b, Wiltfang et al. 2004, 2008). Die Wirkung des PRP's ist abhängig von der der Thrombozytenkonzentration und der Konzentration der Wachstumsfaktoren im Plasma. Nach Marx sollte die Thrombozytenkonzentration bei ca. Faktor 5 liegen.

Das im PRP enthaltene PDGF wirkt als Mitogen auf Zellen und ist an der Wundheilung beteiligt. Es wird in Megakaryozyten, den Progenitorzellen der Thrombozyten, gebildet und nach der Aggregation beim Wundheilungsprozess freigesetzt. Es sorgt hier für das Einsprossen der Gefäße (Angiogenese) und somit für eine Beschleunigung der Heilung. Dies wurde in experimentellen Studien mit einer lokalen Applikation von PDGF gezeigt (Graham 1998, Limat & French 1999).

TGF- β fasst eine große Gruppe von Wachstums- und Differenzierungsfaktoren zusammen, zu denen alle BMP's gehören (Celeste et al. 1990). Seine Hauptaufgabe ist die Knochenneubildung durch Aktivierung der Präosteoblasten und Hemmung der Osteoklasten (McCarthy et al. 2000). Es befindet sich vor allem in den Plättchen und dem Knochen, ferner auch in Mono- und Leukozyten. Experimentell konnte die osteogene Wirkung durch lokal appliziertes TGF- β gezeigt werden (Noda & Camilliere 1989).

IGF befindet sich in den Osteoblasten und in den Plättchen. Es hat ebenfalls eine mitogene Wirkung auf die Präosteoblasten (McCarthy et al. 2000).

1.5 Tissue Engineering

Die Methode des Tissue Engineering (Gewebezüchtung) beruht auf der Kultivierung von lebenden Zellen eines Organismus außerhalb des Zielgewebes unter Laborbedingungen, um diese dann in den größtenteils selben Organismus zu implantieren und so eine Gewebefunktion zu erhalten oder wiederherzustellen. Ziel ist eher das Wachstum von neuem, funktionalem Gewebe als das Züchten von ganzen „Ersatzteilen“ (Kneser et al. 2006).

Das zellbasierte Tissue Engineering scheint im Bereich der Regeneration und Reparation von Knochendefekten eine viel versprechende Methode zu sein. Ziel ist ein biologischer Ersatz, welcher die Gewebsregeneration unterstützt (Mao et al. 2006). Es stellt somit eine Alternative zu autologen Transplantaten und dem Problem der Morbidität der Spenderregion und zu Ersatzmaterialien mit den Nachteilen der langen Einheilphase und dem inhomogenen Knochenwachstum im Augmentat dar.

In verschiedenen tierexperimentellen Studien wurde der Einsatz von knochenbildenden Zellen wie Osteoblasten, Osteoprogenitorzellen und BMSC (bone marrow stromal cells) zur Verbesserung der Knochenregeneration auf einem Trägergerüst erfolgreich getestet. So kam es zu einer gesteigerten

Knochenregeneration in segmentalen Defekten des Unterkiefers in scharfen (Petite et al. 2000, Schliephake et al. 2001), kranialen Defekten bei Ratten (van den Dolder et al. 2003) und alveolären Knochendefekten bei Hunden (Weng et al. 2006). Pierie und Mitarbeiter zeigten, dass das Verwenden von mit MSC's (mesenchymal stem cells) besiedeltem Fluorohydroxylapatit (FH) und die Zugabe von PRP beim Sinuslift am Minischwein zu einer verbesserten Knochenbildung und Osseointegration führen (Pieri et al. 2008).

In vorherigen Studien wurde gezeigt, dass Bio-Oss® Spongiosa Granulat eine ausgezeichnete Biokompatibilität besitzt und als Trägermaterial für ein dreidimensionales Knochen Zellkultur-System geeignet ist und somit Potenzial für durch Tissue Engineering induziertes Wachstum von menschlichen Knochen besitzt (Acil et al. 2000, 2002). Das mit Osteoprogenitorzellen besiedelte Bio-Oss® war nach sechs Wochen Kulturdauer von mehreren Zellschichten überzogen und es waren Anhäufungen von reifen Kollagenfibrillen (Knochenkollagen Typ I) zu erkennen. Der Anteil an knochentypischem Hydroxylsilylpyridinolin (HP) und Lysylpyridinolin (LP) stieg zeitabhängig in dieser Schicht. Die synthetisierten Strukturen ähnelten stark dem natürlichen Knochen. Das Verwenden dieser besiedelten Knochenersatzmaterialien könnte also zu einer beschleunigten Einheilung und einer besseren Osseointegration der Implantate und somit auch zu einer kürzeren Einheilphase führen, was wiederum die prothetische Rehabilitation des Patienten beschleunigen würde.

1.6 Fragestellung

Die Hypothese lautet: In vitro kultivierte autologe Knochenvorläuferzellen welche auf Bio-Oss® Spongiosa Granulat angesiedelt werden führen zu einer verstärkten Osseointegration eines Implantats und zu einer höheren Knochendichte bei der Sinusbodenaugmentation.

Ziel der vorliegenden Studie am Tiermodell ist es, zu diskutieren, ob das Besiedeln von Bio-Oss® Granulat mit autologen Osteoblastenvorläuferzellen, welche in Zellkulturen durch Tissue Engineering hergestellt werden, osteoinduktiv wirkt und die Osseointegration des Implantates im Gegensatz zur zellfreien Seite verstärkt.

2. MATERIAL UND METHODE

2.1 Auswahl der Versuchstiere und Tierhaltung

Die Studie wurde durch das Ministerium für Umwelt, Natur und Forsten des Landes Schleswig –Holstein genehmigt (V 742-72241.121-14 15-2/04).

Als Versuchstier für die Studie wurde das Göttinger Minischwein (Ellegard Göttinger Minipigs ApS, Dalmose, Denmark) ausgewählt und die von Terheyden und Mitarbeitern (Terheyden et al. 1999) beschriebene Sinusbodenaugmentation mit extraoralem Zugang angewendet.

Das Durchschnittsalter der 6 verwendeten Tiere weiblichen Geschlechts betrug 23 Monate und das Gewicht lag zwischen 34,00 und 38,50 kg. Die Tiere wurden in der Bundesforschungsanstalt für Ernährung und Lebensmittel Schaedbek (bei Kiel) gehalten und auch operiert. Gefüttert wurden die Tiere mit 2 x 150 g / Tag Standard-Soft-Diät (Altromin® 9023, Altromin International GmbH, Lage, Deutschland) und Wasser zur freien Verfügung.

2.2 Versuchsaufbau und Zielgrößen

An sechs Göttinger Minischweinen wurde eine beidseitige Sinusbodenelevation mit extraoralem Zugang durchgeführt und Bio-Oss® mit in einer Zellkultur kultivierten autologen Osteoblasten (Testseite) gegen zellfreies Bio-Oss® (Kontrollseite) unter der beidseitigen Zugabe von PRP getestet (vgl. Tabelle 1). Dieses PRP wird unmittelbar präoperativ durch Zentrifugieren von Vollblut nach Marx hergestellt (Marx et al. 1998). Auf beiden Seiten wurde ein Dentalimplantat in das Augmentat primär inseriert. Der Beobachtungszeitraum für die Einheilphase der Implantate betrug 6 Wochen. Eine polychrome Sequenzmarkierung wurde vorgenommen. Die Präparate wurden als unentkalkte Hartschliffpräparate hergestellt und histomorphometrisch durch Mikroradiographie ausgewertet. Eine Fluoreszenzmikroskopie sowie eine histologische Untersuchung der toluidinblau gefärbten Präparate wurden durchgeführt. Die Zielgrößen waren Augmentationshöhe, Knochendichte und Knochenimplantatkontakt.

Rechte Kieferhöhle (Testseite)	Linke Kieferhöhle (Kontrollseite)
1g Bio-Oss® Spongiosa Granulat 1-2 mm (Geistliche Pharma AG, Wolhusen, Schweiz)	1g Bio-Oss® Spongiosa Granulat 1-2 mm (Geistliche Pharma AG, Wolhusen, Schweiz)
Autologe Osteoblasten	
Autologes PRP (1 ml + 0,1 ml Thrombin)	Autologes PRP (1 ml + 0,1 ml Thrombin)
ITI® Standard Implantat SLA 14mm Ø 4.1 mm RN (Institut Straumann AG, Basel, Schweiz)	ITI® Standard Implantat SLA 14mm Ø 4.1 mm RN (Institut Straumann AG, Basel, Schweiz)

Tabelle 1: Verteilung der Versuchsgruppen bei der Sinusbodenaugmentation mit simultaner Implantatinserion an sechs Minischweinen (n = 6)

2.3 Verwendetes Knochenersatzmaterial

Bio-Oss® Spongiosa Granulat (Geistliche Pharma AG, Wolhusen, Schweiz) ist ein natürliches Knochenmineral für den Knochenersatz in der Zahnheilkunde und ist klinisch als Knochenersatzmaterial gut dokumentiert. Es handelt sich um ein natürliches Knochenmaterial bovinen Ursprungs, das aus spongiösen Knochen des Rindes hergestellt wird. Es handelt sich um die reine mineralische Phase von Rinderknochenmatrix. Alle organischen Bestandteile des bovinen Knochens wurden in einem mehrstufigen Reinigungsprozess vollständig entfernt, so dass eine hochreine, osteokonduktive Mineralstruktur entsteht. Gesichert ist diese Methode durch das Fehlen einer immunologischen Reaktion in vivo (Cohen & Mullarky 1993) und durch drei chemische Methoden mit einer Sensibilität von 4 bis 135 ppm (Bereiter et al. 1991). Dabei bleiben die ursprünglichen Eigenschaften der natürlichen Mineralstruktur unverändert, die aufgrund der natürlichen Herkunft chemisch weitgehend vergleichbar mit der mineralisierten menschlichen Knochenstruktur ist (feinkristalliner natürlicher Apatit). Daher wird das Material durch natürliche Abbauvorgänge im Knochen (Osteoklasenaktivität) langsam umgebaut bzw. resorbiert (physiologisches Remodeling). Durch die weitmaschigen interkonnektierenden Poren und die natürliche Zusammensetzung werden die

Bildung und das Einwachsen von neuen Knochen am Augmentationsort begünstigt. Dies bedeutet, dass Bio-Oss® Spongiosa Granulat durch seine Porösität ein ideales Material zur Osteokonduktion darstellt (Terheyden et al. 1997). Die guten Eigenschaften des Knochenersatzmaterials wurden in mehreren experimentellen Untersuchungen am Menschen und am Tier klinisch und histologisch unter Beweis gestellt. Die erfolgreiche Augmentation des Sinus maxillaris mit Bio-Oss® Spongiosa Granulat wird unter anderem durch eine klinische Langzeitstudie von Piattelli et al. (1999) gestützt.

2.4 Verwendete Dentalimplantate

Das ITI® Dental Implantat System (Institut Straumann AG, Basel, Schweiz) besteht aus reinem Titan Grad 4. Wir benutzten das Standard Implantat mit einer Länge von 14 mm und einem Durchmesser von 4,1 mm. Dieses Implantat ist für alle Indikationen oraler enossaler Implantate in Unter- wie auch Oberkiefer bei einer Kieferkammbreite von mindestens 6,1 mm anwendbar. Die SLA-Behandlung (**S**and-blased, **L**arge grit, **A**cid-etched) vergrößert die Implantatoberfläche um 12 % und fördert so die Osseointegration (Schroeder et al. 1976). Sie ist somit einer glatten Oberfläche in der Stärke des Knochenkontaktes und der Frühbelastung überlegen. Die SLA-Oberfläche entsteht durch Sandstrahlen mit Korund-Partikeln und Ätzen der entstandenen Makrorauheit in einem Säurebad (HCL und H₂SO₄). Dadurch entstehen 2-4 µm Mikrogrübchen die der grob sandgestrahlten Sandfläche eingelagert sind. Das Gewinde des Implantates ist poliert und besitzt einen Regular Neck (RN) mit einem Durchmesser von 4,8 mm. Es vergrößert die Implantatoberfläche um 40%. Das Straumann Standard Implantat mit enossaler SLA-Oberfläche hat bei einer Einheilzeit von 6 Wochen eine Implantatüberlebensrate von 98,6 %, über 5 Jahre nach der prothetischen Versorgung (Buser et al. 1997).

2.5 Herstellung des plättchenreichen Plasmas (PRP)

Die Blutabnahme erfolgte unmittelbar vor dem operativen Eingriff aus der Vena jugularis interna. Dafür wurde der Bereich oberhalb des Sternums mit Kodan Forte Tinktur (Schülke & Mayr GmbH, Norderstedt, Germany) desinfiziert und die Vena jugularis interna median des M. sternocleidomastoideus und oberhalb des Jugulums punktiert. Das Venenblut wurde in vier S-Monovetten á 8,5 ml (S-Monovette, CPDA-

1, Sarsted AG, Nümbrecht, Deutschland) unter ständiger Aspiration abgenommen. Das Verfahren basiert auf der Trennung der verschiedenen Blutkomponenten durch Zentrifugation (Marx et al. 1998) und wurde von Roldan aufgrund der geringen zur Verfügung stehenden Blutmenge modifiziert (Roldan et al. 2004a). Das Vollblut wurde zunächst 7 min bei 1700 U/min ohne Bremse zentrifugiert. Anschließend wurde das Plasma bis zum Erythrozytensediment abdekantiert. Das gewonnene Plasma wurde 10 min bei 3000 U/min mit Bremse zentrifugiert. Das entstandene Sediment besteht aus Plättchen. Das Plasma wurde bis zum Sediment abdekantiert und aufgehoben. Das Sediment, bzw. die Plättchen wurden abschließend mit 2,3 ml Plasma resuspendiert um den gleichen Prozentsatz PRP/Vollblut-Volumen wie von Marx beschrieben zu erreichen. Die Thrombozytenzählung im PRP und im Vollblut erfolgte maschinell mittels Hämatologiesystem (XE-2100, Sysmex, Norderstedt, Deutschland). Das PRP wurde bei Raumtemperatur unter ständiger Bewegung aufbewahrt. Vor der Operation wurde 1ml PRP auf 1g Bio-Oss®, bzw. 1g Bio-Oss® mit Zellkultur gegeben, so dass es gut bedeckt war. Direkt vor dem Einbringen des 1g Bio-Oss® mit PRP links bzw. 1g Bio-Oss®, inkubiert mit in der Zellkultur kultivierten autologen Osteoblasten und PRP rechts, wurde das PRP mit Hilfe von 0,1ml Thrombinlösung/1g Bio-Oss® aktiviert. Die Thrombinspritze wurde aus Tissucol Duo S 1 Immuno (Baxter Deutschland GmbH, Unterschleißheim) entnommen. 1ml enthält 500 I.E. Thrombin (human) und 5,88 mg Calciumchlorid.

2.6 Anästhesie und Medikation

Zur Einleitung der Anästhesie wurden die Tiere mittels einer gemischten Injektionslösung (ca. 6 ml), bestehend aus 3 ml Midazolamhydrochlorid (Midazolam-ratiopharm® 5mg/1 ml, Ulm, Deutschland) und 3 ml Ketaminhydrochlorid (Ketamin 100 Pharmanov GmbH, Hannover, Deutschland), welche intramuskulär hinter dem Ohr verabreicht wurde, betäubt. Je nach Operationsdauer wurden bis zu 6 ml der Injektionslösung nachgespritzt. Die Operation wurde ohne Intubation und Beatmung durchgeführt. Die Vitalwerte wurden während der gesamten Zeit mittels Pulsoxymeter überwacht.

Zur Schmerzlinderung nach der Operation bekamen die Tiere für 2 bis 3 Tage 2 mal täglich 50 mg Tramadol (Tramal®, Grünenthal GmbH, Aachen, Deutschland) und zur Entzündungsprophylaxe 2 mal täglich 875/125 mg Amoxicillin/Clavulansäure

(Augmentan® Filmtabletten, Smith–Kline–Beecham GmbH, München, Deutschland) unter das Futter gemischt.

2.7 Knochenentnahmen

Die Operationsdauer betrug zwischen 20 und 30 Minuten. Unmittelbar vor Operationsbeginn erfolgte die Entnahme von 100ml peripherem Blut für die Herstellung von autogenem Serum. Danach wurde der Bereich der Crista iliaca mittels Rasierer enthaart, gewaschen und großflächig mit Providon-Jod Lösung (Betadine®, Mundipharma) desinfiziert. Mithilfe von Schaumstoffkissen wurden die Tiere in Seitenlage fixiert und mit sterilen Loch- und Seitentüchern abgedeckt. Darauf erfolgte bei den sechs Göttinger Minischweinen die Freilegung der Crista iliaca und die Entnahme in Sedierung der kleinen autologen Spongiosastücken vom Beckenkamm. Die Operationsstelle wurde subcutan mit einer Polyglykolsäure-Naht (Dexon® 2/0, resorbierbar) und cutan mit einer Polyester-Naht (Mersilene® 1/0, Ethicon, Norderstedt, Deutschland) verschlossen. Die Nahtentfernung erfolgte 8-10 Tage postoperativ.

2.8 Herstellung der Zellkultur

Die Knochenexplantate wurden in 0,3 bis 0,5 cm große Fragmente zerkleinert und gründlich mit PBS (pH 7,4) gespült. Aus diesen Fragmenten wurden Auswaskulturen hergestellt, die einmal passagiert wurden. Als Nährmedium diente Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, Biochrom, Berlin, Deutschland), welches mit dem autogenen Serum, 10^5 I.E. / L Penicillin, 100 mg / L Streptomycin, 100 nM Dexamethason (Biochrom, Berlin, Deutschland) und 1 mM L-Ascorbinsäure 2-Phosphat (Sigma, Deisenhofen, Deutschland) ergänzt wurde. Das Medium wurde zweimal pro Woche gewechselt. Die Kulturbedingungen und das Medium begünstigen Kulturen mit einem Anteil von bis zu 90% Osteoblasten (Acil et al. 2000).

2.9 Inkubation von Bio-Oss® mit autologen Osteoblasten

Zur zweiten Passage wurden die Zellen auf Bio-Oss® Granulat angesiedelt (Bio-Oss® Spongiosa 1-2 mm Geistlich), das vorher mit Puffer gespült und 24 Stunden in Nährmedium gelagert wurde. Nach 6 Wochen Kulturdauer war das Granulat dicht von Zellen überwachsen. Die Osteoblastennatur dieser Zellen wurde durch Analyse einer Parallelkultur auf Knochenskollagen Typ I durch Hochdruckflüssigkeitschromatographie sowie immunhistochemisch durch Osteocalcinnachweis untersucht (Acil et al. 2000, 2002). Osteocalcin ist Teil der extrazellulären, nichtkollagenen Knochenmatrix und ein Marker des Knochenaufbaues. Hydroxylsypyrindinolin (HP) und Lysypyrindinolin (LP) sind nicht reduzierbare Quervernetzungen des ausgereiften Kollagens, wobei LP nur in Knochen und Dentin vorkommt. Beide können mittels Hochdruckflüssigkeitschromatographie bestimmt werden und sind daher ebenfalls wichtige Marker (Kap. 2.8 und 2.9 Diss. Kiel 2006).

2.10 Sinusbodenaugmentation mit extraoralem Zugang

Zu Beginn des operativen Eingriffs wurden die Tiere mittels einer gemischten Injektionslösung betäubt (vgl. Kapitel 2.6). Die Dauer betrug zwischen 2 und 3,5 Stunden.

Die Tiere wurden im Bereich zwischen Maxilla und Orbita mit Hilfe eines elektrischen Rasierers rasiert und gründlich gewaschen. Danach wurden sie auf den OP-Tisch gelegt und mit Hilfe von Schaumstoffkissen so fixiert, dass die linke Seite (Placebo-Seite) nach oben zu liegen kam. Daraufhin folgte die großflächige Desinfektion des Operationsbereiches mit Providon-Jod Lösung (Bettaisodona®, Mundipharma). Die Tiere wurden mit sterilen Seitentüchern und einem Lochtuch abgedeckt, so dass die gesamte Operation unter aseptischen Bedingungen durchgeführt werden konnte.

Zur Lokalanästhesie wurde ca. 15 ml Xylocain® 2% mit Adrenalin 1:200 000 (AstraZeneca GmbH, Wedel, Deutschland) mit folgenden wirksamen Bestandteilen verwendet: Lidocainhydrochlorid 20 mg/1 ml und 0,005 mg Epinephrin.

Der gleiche Vorgang wurde auf der rechten Seite wiederholt.

Es wurde eine beidseitige Sinusliftoperation über einen extraoralen Zugang durchgeführt und zwar zuerst auf der Kontrollseite (links) und danach auf der

Testseite (rechts). Der extraorale Zugang erfolgte über eine parallele Schnittführung entlang des Jochbeinmassivs in einem Abstand von ca. 2 cm zur Lidkante. Nach dem subperiostalen Freilegen der lateralen Wand der Maxilla wurde diese anterior des Recessus zygomaticus mit Hilfe einer Kugelfräse gefenstert und so der Zugang zum Sinus maxillaris geschaffen. Die letzte dünne Knochenlamelle wurde mit einer diamantierten Kugel entfernt, da diese die die Kieferhöhle auskleidende Schleimhaut (Schneidersche Membran) nicht so leicht verletzt. Die Schleimhaut wurde vorsichtig, ohne sie zu perforieren, mit einem Elvatorium von H. Zepf-Sinus (Altatec®, Würzburg, Deutschland) mobilisiert um genügend Platz für die Sinusbodenaugmentation und Implantation einer alloplastischen Zahnwurzel (Titanimplantat) zu schaffen (vgl. Abbildung 2).

Die Vorkörnung und die Bohrung erfolgten beidseitig identisch dorsal der Fensterung im Bereich des Jochbeinmassivs (Recessus Zygomaticus) unter Kühlung mit NaCL. Dafür verwendet wurden auf den Implantatdurchmesser abgestimmte Pilot-, Spiral- und Profilbohrer (Straumann AG, Basel, Schweiz), die die perfekte Aufbereitung des Implantatbetts und die optimale Primär- und Sekundärstabilität des Implantates gewährleisten. Die Jochbeinprominenz wurde mit der Kugelfräse auf 5mm reduziert um eine standardisierte Knochendicke für die Platzierung des Implantates zu erreichen, da 5 mm Alveolarkammhöhe als Minimum zur primären Implantatinserterion empfohlen werden (Triplett & Schow 1996). So wurde gewährleistet, dass das Implantat zu ca. zwei Drittel in die freipräparierte Kieferhöhle ragt und vom Augmentat umschlossen wird. Anschließend wurde ein Gewinde mit Hilfe eines Gewindeschneiders (Straumann AG, Basel, Schweiz) geschnitten, um ein traumafreies Einbringen des Implantats in das Implantatbett zu gewährleisten. Nun wurden ein 14 x 4,1 mm ITI® Standard Titanimplantat (Straumann AG, Basel, Schweiz) mit Hilfe einer ebenfalls auf das Implantatsystem abgestimmten Ratsche inseriert. Darauf folgte die Augmentation mit 1g Bio-Oss® mit PRP links bzw. 1g Bio-Oss®, inkubiert mit in der Zellkultur kultivierten autologen Osteoblasten und PRP rechts. Dabei wurde darauf geachtet, dass das Implantat von allen Seiten vom Augmentat umschlossen war (vgl. Abbildung 1). Die simultane Implantatinserterion erfolgte nach der Beschreibung von Terheyden (Terheyden et al. 1999).

Nach Abschluss der Augmentation wurde die Wunde subcutan mit einer resorbierbaren Polyglycolsäure-Naht (Dexon® 2/0, Braun-Dexon GmbH, Spangenberg, Deutschland) und cutan mit einer Polyester-Naht (Mersilene® 1/0,

Ethicon, Norderstedt, Deutschland) verschlossen. Die Nahtentfernung erfolgte 8-10 Tage postoperativ. Postoperative Medikamente siehe Kapitel 2.6



Abbildung 1: Darstellung der Implantatlage im Jochbeinmassiv und des Augmentates im Sinus maxillaris in der Ansicht vorn halbseitlich eines mazerierten Minischweinschädels (aus Diss Schmidt, C., H-J, 2005.).

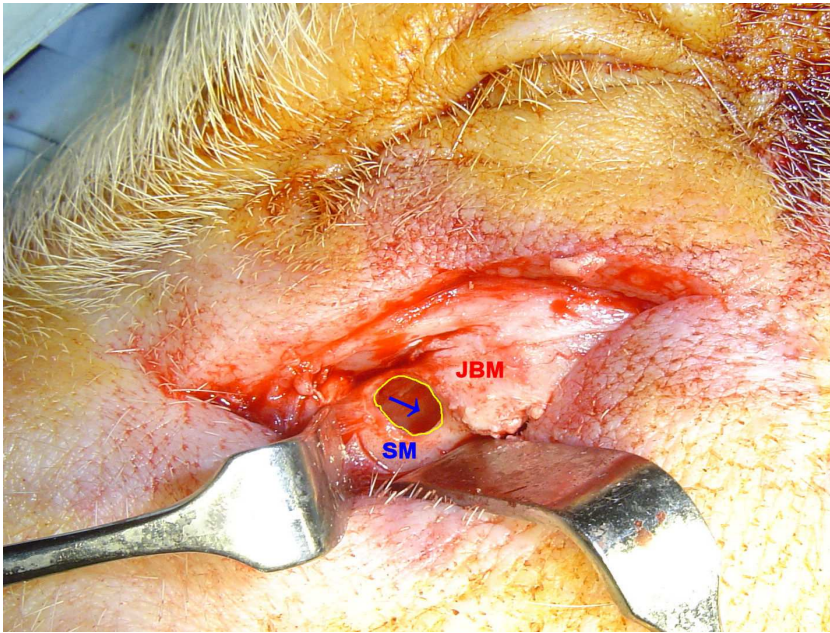


Abbildung 2: Intraoperative Aufnahme der Sinusbodenaugmentation links. Zugang zum Sinus maxillaris (SM →) mit dahinter liegender Schneider'scher Membran im Jochbeinmassiv (JBM)

2.11 Intravitale polychrome Sequenzmarkierung

Vierzehn Tage postoperativ wurde mit der intravitalem polychromen Sequenzmarkierung unter Sedierung mit 3 ml Tilest® (Pharma & Upjohn, Erlangen, Deutschland) begonnen. Die intraperitoneale Injektion erfolgte mittels Spritze und Braunüle®. Mit den verschiedenen Fluorochromen Xylenolorange (gelb), Calceingrün (grün), Alizarinkomplexon (rot) und Tetrazyklin (braun) wird eine sequenzielle Markierung der Knochenapposition vorgenommen. Diese Fluorochrommarkierung basiert auf der Arbeit von Rahn (Rahn 1976). Die genaue Abfolge und die Dosierung der Knochensequenzmarkierung in Tabelle 2 dargestellt.

Injektionszeitpunkt	Fluoreszenzfarbstoff	Dosierung
14. postoperativer Tag	Xylenolorange 6%ige Lösung in 2% NaHCO ₃	1,5 ml /kg Körpergewicht
21. postoperativer Tag	Calceingrün 1%ige Lösung in 2 % NaHCO ₃	5 ml /kg Körpergewicht
28. postoperativer Tag	Alizarinkomplexon 3%ige Lösung in 2 % NaHCO ₃	0,83 ml /kg Körpergewicht
35. postoperativer Tag	Tetrazyklin (Doxycyclin RatiopharmSF [®] , Ratiopharm GmbH&Co, Ulm)	1,5 ml /kg Körpergewicht

Tabelle 2: Schema der Intravitalen polychrome Sequenzmarkierung

Jede dieser Farben erzeugt im fluoreszenzmikroskopischen Bild eine Bande, anhand welcher man die Knochenwachstumsgeschwindigkeit beurteilen kann (ausschlaggebend ist der Abstand der Banden).

2.12 Intraversale Perfusion

Die sechs Göttinger Minischweine wurden sechs Wochen postoperativ in tiefer Narkose gelegt (vgl. Kapitel 2.6) und durch intraversale kardiale Perfusion getötet. Hierfür wurde der Thorax mittels Sternotomie mit einer Säge unter ständiger Blutstillung geöffnet und anschließend der Perikardbeutel von der Herzspitze her sorgfältig eröffnet. Dabei wurde darauf geachtet, dass kein Pneumothorax verursacht wurde. Darauf folgten die Darstellung der Aortenwurzel vom Perikard her und die Umschlingung dieser mit einer kräftigen Ligatur. Anschließend wurde der linke Ventrikel des schlagenden Herzens an der Herzspitze mit einem Skalpell Nr. 11 inzidiert und die Kanüle des Windkessel-Perfusionssystems durch den Ventrikel in die Aorta ascendens vorgeschoben. An der Kanülenspitze befand sich eine Kunststoffkugel, hinter der die Kanüle zur Abdichtung gegen die Aorta mit der zuvor

gelegten Ligatur gesichert wurde. Nun wurde der rechte Vorhof und die Vena cava eröffnet, um den Blutabfluss zu ermöglichen. Anschließend begann die intravasale Perfusion, bei der der Kreislauf zuerst mit 10 Liter physiologischer Kochsalzlösung unter 120 mmHg arteriellem Druck gespült wurde, bis der Rückfluss aus der Vena cava klar erschien. Anschließend folgte das Spülen zur Vorfixierung des Gewebes mit ca. 10 Liter Perfusionslösung (vgl. Tabelle 3).

Das Perfussionssystem bestand aus vier in Serie geschalteten Flaschen, die nach dem Windkesselprinzip aufgebaut waren und mit 120 mmHg O₂ gespeist wurden (vgl. Abbildung 3). Durch Abklemmen der einzelnen Schläuche wurde gewährleistet, dass das Gewebe zuerst von der Spüllösung und anschließend von der Perfusionslösung mit konstantem Druck von 120 mmHg perfundiert wurde.

10 Liter Perfusionslösung	800 ml Formalin 37% + 10000 ml Glutardialdehyd + 8200 ml Sørensenpuffer
10 Liter Sørensenpuffer	136,09 g Kaliumdihydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄) in 10 Liter Aqua dest. lösen; 178 g Natriumdihydrogenphosphat (NaH ₂ PO ₄) in 10 Liter Aqua dest. Lösen; anschließend 1600 ml KH ₂ PO ₄ und 8400 ml NaH ₂ PO ₄ mischen und den pH wert kontrollieren (pH = 7,4). Er kann gegebenenfalls mittels Natronlauge oder HCL eingestellt werden.

Tabelle 3: Zusammensetzung der Perfusionslösung

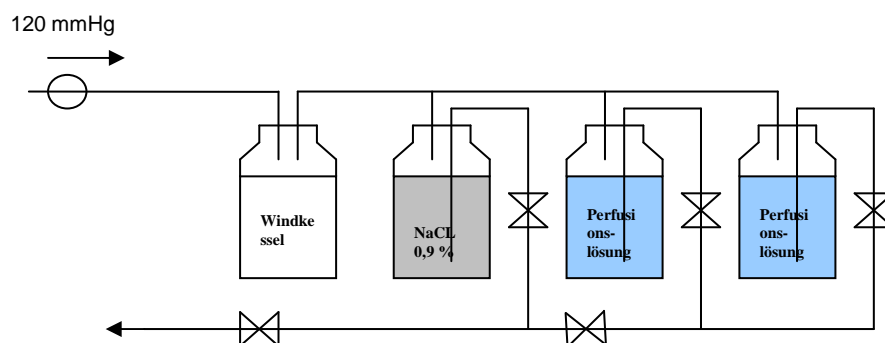


Abbildung 3: Perfusionssystem bestehend aus mehreren in Serie angeschlossenen Flaschen, aufgebaut nach dem Windkesselprinzip mit 120 mmHg O₂

2.13 Herstellen der Präparate

Die unentkalkten, in Methacrylat eingebetteten Hartschliffpräparate wurden nach der Methode von Donath und Breuner (Donath & Breuner 1982) hergestellt.

2.13.1 Vorbereitung und Fixierung der Präparate

Nach der Operation wurde den Göttinger Minischweinen der Kopf dekapitiert und 10 Tage in 10%igem Formalin gelagert. Danach folgten die subperiostale Mobilisation des Weichgewebes und die vorsichtige Freilegung des Implantatkopfes. Unter Berücksichtigung der Implantatachse und des eingebrachten Augmentats wurde zuerst per Handsäge ein grobes Präparat herausgeschnitten, und anschließend mit einer diamantierten Elektrosäge (Exakt 310, Fa. Exakt, Norderstedt) unter Kühlung mit Aqua dest. auf die gewünschte Größe zurecht gesägt. Dabei war wichtig, dass die Präparate nicht zu groß waren, damit die Fixierungs- und Einbettmedien schneller und besser in das gesamte Gewebe eindringen konnten. Danach wurden die Präparate erneut in beschrifteten Gläsern einzeln für 10 Tage in 10%igem Formalin gelagert und dadurch fixiert.

2.13.2 Entwässerung und Einbetten der Präparate

Vor dem Einbetten der unentkalkten Präparate wurden diese zunächst in einer aufsteigenden Alkoholreihe dehydriert. Dafür wurden die Präparate einzeln in Mullkompressen eingebunden und mit einem Zettel zur späteren Wiedererkennung markiert. Um eine unvollständige Entfettung der Präparate zu verhindern, die später die Polymerisation des Einbettmediums behindern würde, wurde das Gewebe in einer Aceton-Ethanol-Mischung entfettet. Das Aceton wurde anschließend mit Ethanol gründlich ausgewaschen, da Acetonreste zur Blasenbildung bei der Polymerisation im Einbettkunststoff führen können. Nach dem Spülen wurden die Präparate zunächst in Methacrylsäuremethylester (Merk, stabilisiert mit 500 ppm Hydrochinon) und anschließend in das endgültige Einbettmedium gelegt [Lösung aus 500 mg Methacrylsäuremethylester und 3 g Azoisobutyronitril (Fluka Chemie AG, Darmstadt), 100 ml Nonylphenolpolyglycolaetheracetat (Walter GmbH, Kiel) und 5 ml

Phthalsäuredibutylester (Merk AG, Darmstadt)]. Der ganze Vorgang betrug 12 Stationen und wurde in einem automatischen Einbettgerät (PSI Typ 1.412.00, Pool of Scientific Instruments Ltd.; Ch 4010 Basel, Schweiz) durchgeführt (vgl. Tabelle 4). Nach der Dehydratation wurden die Präparate für 14 Tage in dem Einbettmedium getränkt. Das Medium wurde bei 4°C gelagert, damit es nicht polymerisiert. Vor dem Einbetten wurden die Präparate aus dem Einbettmedium entnommen, der Kompressenbeutel entfernt, und in den Implantatkopf ein Rundholz geklebt, um die Implantatachse nach dem Einbetten besser beurteilen zu können. Als Einbettgläser dienten Rollrandgläser, die vorher gesockelt wurden. Dabei wurden die Gläser 2-3 cm hoch mit Einbettmedium gefüllt und im Wasserbad bei 38°C polymerisiert. Dadurch wurde gewährleistet, dass die Präparate den Glasboden nicht berühren. Nun wurden die Präparate in die Gläser gelegt, mit einem Zettel mit Präparatnummer und Datum markiert und ca. 3-4 cm Einbettmedium in die Gläser gefüllt und ins 32°C warme Wasserbad gestellt. Wichtig war, dass das Präparat die Glaswand nicht berührt und so überall von Kunststoff umschlossen werden kann und dass es nicht zur Blasenbildung im Kunststoff kommt, was durch ein festes Verschließen der Gläser, ein nicht zu warmes Wasserbad und das Einfüllen von nicht zu viel Einbettmedium gewährleistet wurde. Die Gläser wurden für 5-8 Tage im Wasserbad gelagert und polymerisiert. Die entstehende Wärme wurde durch das Wasser abgeleitet. Der Vorgang wurde 2-3-mal wiederholt und erneut Einbettmedium aufgegossen, bis die Präparate ca. 2 cm mit Kunststoff bedeckt waren. Nun wurden die ausgehärteten Blöcke durch Zerschlagen der Gläser befreit und nicht vollständig polymerisierte Reste mit dem Skalpell entfernt.

Einbettmedium	Dauer	Temperatur
60% Ethanol	2 Stunden	Raumtemperatur
80% Ethanol	2 Stunden	Raumtemperatur
90% Ethanol	2 Stunden	Raumtemperatur
96% Ethanol	2 Stunden	Raumtemperatur
100% Ethanol	2 Stunden	Raumtemperatur
Aceton-Ethanol 1:1	1 Stunde	Raumtemperatur
Aceton-Ethanol 1:1	2 Stunden	Raumtemperatur
100% Ethanol	1 Stunde	Raumtemperatur
100% Ethanol	2 Stunden	Raumtemperatur
100% Ethanol	2 Stunden	Raumtemperatur
Methacrylsäuremethylester	10 Stunden	Raumtemperatur
Einbettmedium	14-21 Tage	4°C

Tabelle 4: Entwässerungs- und Einbettschema

2.13.3 Herstellung der unentkalkten Hartschliffpräparate

Nach dem Ausbetten wurden die Methacrylatblöcke mit einer groben Bandsäge (Metabowerke, Nürtingen, Deutschland) zugeschnitten. Vorher wurde die Schnittführung mit Hilfe eines wasserfesten Stiftes markiert, und zwar in Orientierung an der Implantatachse. Dies war sehr wichtig, da auf den Schnitten das Implantat in voller Länge angeschnitten sein muss, das heißt, die Implantatmittelachseachse liegt später im histologischen Schnitt. Nun wurden die milchig-weißen Blöcke mit einem Schleif- und Poliergerät (Saphir 360, ATA GmbH, Kaltenkirchen, Deutschland) unter Wasserkühlung und mit unterschiedlich feinem Siliciumkarbid-Nassschleifpapier in der Reihenfolge 500, 1200, 2400 und 4000 µm geglättet, bis diese klar und durchsichtig erschienen. Auf einer vorher festgelegten Seite wurde unter Berücksichtigung der Implantatachse bis an das Implantat herangeschliffen und diese Seite besonders gründlich poliert, da sie später den ersten Schnitt darstellte. Aus diesem Grund war ebenfalls wichtig, dass die knöchernen Strukturen des Sinus maxillaris und das eingebrachte Augmentat gut zu sehen waren (vgl. Abbildung 4). Zur Identifizierung der Präparate wurde die Identifikationsnummer der Tiere mittels einer Fräse in den Methacrylatblock eingraviert. Nun wurden die Blöcke mit der ausgewählten Seite auf die mit Klebefolie beschichteten Objektträger geklebt. Dafür wurden 5 x 10 cm große Plexiglasobjektträger ausgewählt und vorbereitet. Die Schutzfolie wurde an beiden Seiten entfernt und die Identifikationsnummer des jeweiligen Tieres, das Jahr und die Schliffnummer in den Objektträger eingraviert. Als nächstes erfolgte die Entfettung der nicht befrästen Seite mit 100% Ethanol und das Beschichten mit der Klebefolie (Gudy 875, Fa. Neeschen GmbH und Co, Brückeburg). Diese wurde auf Objektträgergröße zurechtgeschnitten und nach dem Entfernen der Schutzfolie vorsichtig unter Vermeiden von Luftblasen und Falten auf die entfettete Seite des Objektträgers geklebt. Nun wurden die ausgewählte Seite des Methacrylatblockes und die Oberseite des Objektträgers bzw. die Klebefolie mit 100% Ethanol entfettet. Nachdem der Ethanol verdunstet war, wurden einige Tropfen Sekundenkleber (Loctite 493 für Metall, niedrigviskös, Loctite GmbH, München) auf den Objektträger in einer Linie aufgetragen, der Block mit einer Kante in den Kleber gesetzt und vorsichtig auf dem Objektträger abgesetzt, so dass sich der Kleber unter dem gesamten Block verteilte. Jetzt wurde er für 60 Sekunden fest angedrückt und anschließend mit einem Gewicht für 25 min zum Aushärten des Klebers gesichert.

Nun folgte das Sägen der Schliffe mit der Exakt-Mikrofeinsäge (Exakt 310 cp, Fa. Exakt, Norderstedt). Die Säge verfügte über eine Präzisions-Parallelführung und ein diamantiertes Trennschleifsystem. Dies ermöglichte es, den Objektträger mitsamt des Blockes mittels einer Vakuumplatte zu fixieren und so parallel zum Objektträger ca. 200 µm dicke Schnitte unter Kühlung mit Aqua dest. anzufertigen, welche am Objektträger klebten. Der Block konnte nun mitsamt dem Präparat erneut poliert werden und wie eben beschrieben erneut behandelt werden. Die Schnitte wurden jetzt exakt vermessen und in einem Schleifautomaten (Exakt-Mikroschleifsystem, Fa. Exakt, Norderstedt) mit 1200 µm Siliciumkarbid-Nassschleifpapier und unter ständiger Wasserkühlung auf 100 µm heruntergeschliffen. Danach erfolgte die Reduktion auf 90 µm und das Polieren an dem oben beschriebenen Schleif- und Poliergerät per Hand mit 2400 und 4000 µm Siliciumkarbid-Nassschleifpapier, ebenfalls unter Wasserkühlung. Die Stärke der Präparate wurde ständig gemessen und das Ergebnis unter dem Mikroskop kontrolliert. Es war erst als geeignet anzusehen, wenn keine Kratzer oder Riefen mehr zu erkennen waren (vgl. Abbildung 4).

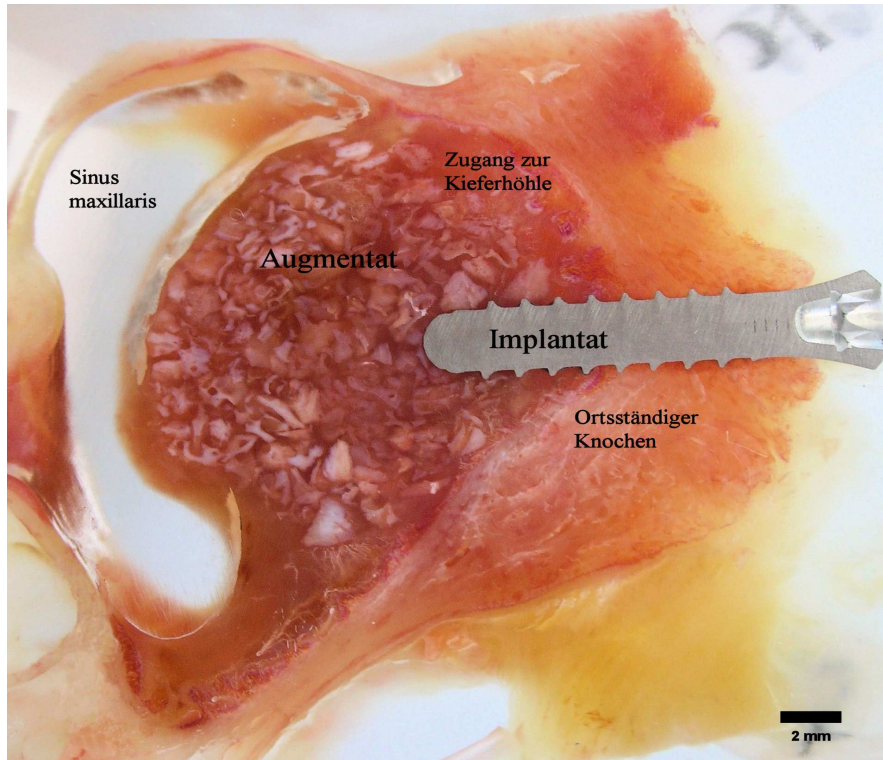


Abbildung 4: Hartschliffpräparat der Testseite mit Bio-Oss[®], autologen Osteoblasten und PRP. Angeschnitten ist das Implantat, der ortsständige Knochen des Jochbeins, das Augmentat und der Sinus maxillaris. Die rote Farbe ergibt sich durch die Fluorochrome

2.14 Mikroradiographie

Die Mikroradiographie ist eine Röntgenkontaktaufnahme von mineralisierten Hartgewebsschliffen. Das Verfahren wurde 1944 von Bohatyrtshuk entdeckt (Bohatyrtshuk 1944) und später weiterentwickelt, so dass mit der Mikroradiographie heute Auflösungen bis zu einem Mikron erreicht werden können.

Die gewünschte Schliffdicke bei der Mikroradiographie lag zwischen 80 und 100 µm. Daher wurden die Schliffe wie in Kapitel 2.10.3 beschrieben auf 90 µm herunter geschliffen und poliert. Nun wurde die Folie, die vorher auf den Objektträger geklebt wurde, mitsamt dem Präparat vorsichtig und möglichst flach abgezogen und auf Größe des Objektträgers zurechtgeschnitten. Zum Knickschutz wurde die Folie zwischen zwei Objektträgern gelagert, die zur Identifikation gekennzeichnet waren. Die nun folgenden Schritte wurden im Dunkeln unter Rotlicht ausgeführt, da die Röntgenplatten (High Resolution X-ray Plate, Microchrome Technology Inc., San José, Nevada, USA) sehr lichtempfindlich sind. Die Röntgenplatten haben eine beschichtete und eine unbeschichtete Seite. In die beschichtete Seite wurde mittels Diamantschreiber die studienrelevanten Daten eingraviert und das Präparat mit „dem Gesicht nach unten“ mittels Tesafilm fixiert. Bei 3 mAs und 25 kV erfolgte nun die neunminütige Belichtung (pro 10 µm Dicke 1 min) im Mikroradiographieautomaten (Faxitron X-ray Systems Hewlett Packard GmbH Böblingen, Deutschland). Während der Belichtungszeit wurden der Entwickler, das Stoppbad und das Fixierbad angesetzt (siehe Tabelle 5). Nach Beendigung des Belichtungsvorganges wurden die Platten aus dem Mikroradiographieautomaten entnommen, die Folie mitsamt dem Präparat entfernt und die Mikroradiographien in einem Diaständer bei ständiger Bewegung in der in Tabelle 5 beschriebenen Abfolge entwickelt. Danach folgte eine Wasserung unter fließendem Wasser und ein Spülen in Agepon (Fa. Agfa-Gevaert, Leverkusen, Deutschland), damit es beim Trocknen nicht zur Bildung von Kalkflecken kommt. Nach dem Trocknen wurden die belichteten Seiten der Platten zum Schutz und zur Konservierung mit Deckgläsern und Eukitt abgedeckt.

Unter dem Mikroskop kann nun anhand der Mikroradiographien durch die verschiedenen Graustufen alter, stärker mineralisierter Knochen von jungem, weniger mineralisiertem Knochen unterschieden und ausgewertet werden (Stürmer 1979). Neu appositionierter Knochen wird durch die geringere Mineralisation und die

entsprechend geringere Strahlenabsorption dunkler (dunkles Grau) dargestellt als älterer, stärker mineralisierter Knochen (helles Grau). Die Bio-Oss[®] Partikel stellen sich ebenfalls hellgrau dar. Die Mikroradiographien wurden mittels computergestütztem Bildanalysesystem (Q 500 MC, Fa. Leica, Cambridge, England) digital vermessen, wobei die Histomorphometrie auf der digitalen Bearbeitung der Grautöne basiert. Das Bild wurde mittels Videokamera (Tk 1280E, Fa. JVC, Tokyo, Japan) vom Fotomikroskop (Microphoto-FXA, Tokyo, Japan) auf den Computer übertragen.

Lösung	Zusammensetzung	Verweildauer in den einzelnen Behältern
Entwickler	100 ml Stocklösung (JRP-Developer [®] , Kodak, Stuttgart) + 300 ml Aqua dest.	5 min.
Stopppbad	4 ml Eisessig + 400 ml Aqua dest.	2 min.
Fixierungsbad	100 ml Fixierer (Fixer 3000A [®] , Kodak, Stuttgart)	10 min.

Tabelle 5: Zusammensetzung und Anordnung der verschiedenen Lösungen zur Entwicklung der Mikroradiographien bei einer Temperatur von 20 °C.

2.15 Fluoreszenzmikroskopie

Die Fluoreszenzmikroskopie lässt einen Einblick in das dynamische Knochenwachstum zu. Die Fluorochrome, die den Tieren während der polychromen Sequenzmarkierung injiziert wurden (siehe Kapitel 2.8), binden als Chelatbildner an Calciumionen und werden daher bei der Mineralisation in den neu gebildeten Knochen, also in das Hydroxylapatit eingebaut. Daher kann man eine zeitliche Aussage über die Osseointegration der Implantate, das Knochenwachstum und die Umbauvorgänge am Knochenersatzmaterial treffen. Dies wäre mit der standard Histologie nicht möglich, da diese nur den Zustand des Zelltodes wiedergibt. Die bei der lamellären Knochenbildung im Bereich der kortikalen Strukturen eingelagerten

Fluoreszenzfarbstoffe stellen sich unter Anregung von Blaulicht bei einer Wellenlänge von 450 und 490 nm als begrenzte, scharfe Linien dar.

Die Präparate wurden nach Beendigung der Mikroradiographie erneut auf Objektträger zurückgeklebt. Dafür wurden die Objektträger mittels Gravur mit den relevanten Daten markiert und mit 100%igem Ethanol entfettet. Nach dem Verdunsten des Ethanols wurden einige Tropfen Kleber (Technovit 7210 VLC lighthärtend, Fa. Exakt, Norderstedt) in einer Linie auf den Objektträger gegeben und die Folie präparatseitig vorsichtig aufgeklebt, ohne das dabei Blasen unter dem Präparat entstanden. Nach dem fünfzehnminütigen Aushärten unter Blaulicht und Druck wurde die Folie vorsichtig abgezogen. Das Präparat verblieb auf dem Objektträger und konnte nun mittels Schleifautomaten (Exakt-Mikroschleifsystem, Fa. Exakt, Norderstedt) auf 30 µm heruntergeschliffen und anschließend poliert werden (siehe Kapitel 2.10.3). Nun konnten die Schliffe unter einer Quecksilberlampe bei 4-facher Vergrößerung mittels Fotomikroskop (Microphoto-FXA, Nikon, Tokyo, Japan) beurteilt werden.

2.16 Toluidinblaufärbung

Die histologische Auswertung der Präparate erfolgte nach der Toluidinblaufärbung der Dünnschliffe. Toluidinblau ist ein basischer Farbstoff zum Färben histologischer Präparate. Die 30 µm dicken Schliffe wurden 3 Minuten in 0,1%iger Ameisensäure angeätzt und anschließend in Aqua dest. gespült. Darauf folgte die Lagerung in 20%igem Methanol für 1 Stunde und erneutes Spülen in Aqua dest. Nun wurden die Präparate für 4 Minuten in der Toluidinblau-Lösung gefärbt. Nach dem Trocknen wurden die Präparate mittels Eukitt und Deckgläsern versiegelt um ein Verpilzen zu vermeiden. Toluidinblau ist eine Oberflächenfärbung, welche sich in den verschiedenen Geweben unterschiedlich anreichert. Daher ist eine Differenzierung der unterschiedlichen Gewebe über die verschiedenen Blautöne möglich (Knochen→ blassblau, Knorpel→ dunkelblau, Bindegewebe→ unterschiedliche Blautöne). Die Auswertung der Präparate erfolgte mittels digitalen Bildanalysegeräts (siehe Kapitel 2.14)

2.17 Histomorphometrie

Wie in Kapitel 2.11 beschrieben, wurde die Mikroradiographien und Histologien mittels computergestütztem Bildanalysesystem (Q 500 MC, Fa. Leica, Cambridge, England) digital vermessen und mit Hilfe einer Videokamera (Tk 1280E, Fa. JVC, Tokyo, Japan) in zehnfacher Vergrößerung vom Fotomikroskop (Microphoto-FXA, Tokyo, Japan) auf den Computerbildschirm übertragen. Hier wurden folgende Parameter jeweils an Test- und Kontrollseite ausgewertet:

1. Knochen–Implantat-Kontakt:

Die Auswertung fand in den mit der Toluidinblau gefärbten Schritten statt. Der Knochen–Implantat-Kontakt war definiert durch den prozentualen Anteil der Implantatoberfläche jenseits des ortsständigen Knochens, die in direktem Kontakt zum neu generierten Knochen stand. Der Implantatkontakt im ortsständigen Knochen wurde hierbei nicht mit in die Auswertung miteinbezogen.

2. Augmentationshöhe:

Die Augmentationshöhe wurde mit Hilfe der Mikroradiographien gemessen und zwar vom Sinusboden des ortsständigen Knochens bis zur Spitze des neu mineralisierten Knochens im Augmentat in Millimetern.

3. Knochendichte im Augmentat:

Die Knochendichte wurde ebenfalls anhand der Mikroradiographien gemessen. Sie ist definiert als der Flächenanteil an Knochenbälkchen an der Gesamtfläche des Messrahmens in Prozent. Hierfür wurden fünf Messrahmen im basalen Drittel des Augmentats repräsentativ, gleichmäßig und ohne Überlappung verteilt und hieraus der Mittelwert gebildet. Wie in Kapitel 2.11 beschrieben, stellt sich der neu gebildete Knochen durch die geringere Mineralisation dunkelgrau dar. Das Bildanalysesystem identifiziert, digitalisiert und berechnet den neu regenerierten Knochen. Der ortsständige Knochen wurde in diese Berechnung ebenfalls nicht mit einbezogen.

2.18 Statistische Auswertung

Die zuvor ermittelten Werte der Augmentathöhe von Test- und Kontrollseite wurden gemittelt (Median und Mittelwert) und anhand des gepaarten t-Tests mit einem Signifikanzniveau von $p = 0.05$ statistisch ausgewertet. Da bei den Werten von Knochen-Implantat-Kontakt und Knochendichte nicht von einer Normalverteilung ausgegangen werden konnte, wurden diese mit Hilfe des Wilcoxon-^{^^^}Tests statistisch ausgewertet (Signifikanzniveau von $p = 0.05$). Die Werte der Thrombozytenzählung wurden gemittelt und der Anreicherungsfaktor vom Vollblut zum PRP ermittelt.

3. ERGEBNISSE

3.1 Klinik

Bei allen sechs Versuchstieren heilten sowohl die Wunden im Bereich des Beckens als auch der extraorale Zugang zur Kieferhöhle primär, ohne Anzeichen von Wundheilungsstörungen oder eines Infektes ab. Die Tiere tolerierten die Operationen gut, verhielten sich normal und zeigten keinen Gewichtsverlust.

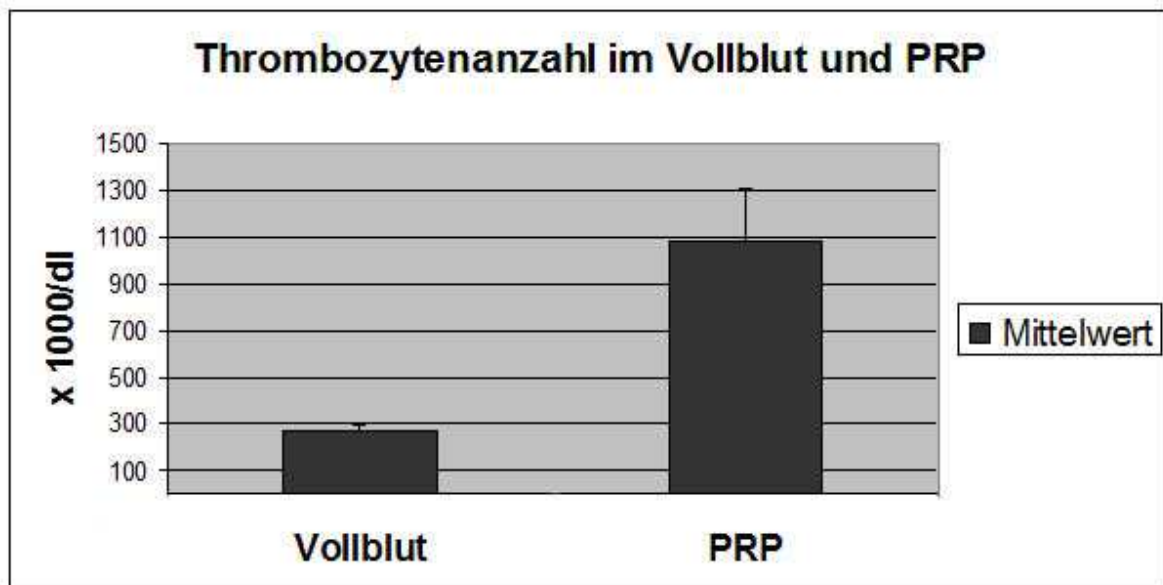
3.2 In-vitro Bestimmung von Zellen auf Bio-Oss®

Die Osteoblastennatur der Zellen wurde anhand der Marker Osteocalcin, Hydroxylsypylpyridinolin (HP) und Lysylpyridinolin (LP) in einer Parallelkultur nachgewiesen. Es kam zu einer positiven Osteocalcinfärbung der Zellen und somit zum Nachweis der Osteoblastennatur der sich auf der Oberfläche des Bio-Oss® befindlichen Zellen.

Die Analyse mittels Hochdruckflüssigkeitschromatographie zeigte die Quervernetzung von HP und LP, was spezifisch für den Knochen-Kollagen Typ 1 ist. Auf der Kontrollprobe (zellfreies Bio-Oss®) wurde kein HP und LP nachgewiesen (Diss. Kiel 2006).

3.3 Zählung der Thrombozyten im Vollblut und plättchenreichen Plasma

Die maschinelle Thrombozytenzählung zeigte einen Mittelwert der Thrombozytenzahl im Vollblut von $266 \times 1000/\text{dl}$ und im PRP von $1078 \times 1000/\text{dl}$ (vgl. Graphik 1). Der Mittelwert des Anreicherungsfaktors lag bei 4,1. Es zeigte sich keine statistisch signifikante Korrelation zwischen der Thrombozytenzählung im Vollblut und im PRP ($p = 0,742$, vgl. Tabelle 6 im Anhang).



Graphik 1: Thrombozytenzählung (Mittelwert und Standardabweichung, $n=6$)

3.4 Mikroradiographie

Apposition von neuem Knochen konnte sowohl auf der Testseite als auch auf der Kontrollseite beobachtet werden, wobei kein offensichtlicher Unterschied zwischen beiden Seiten festgestellt werden konnte. Das Knochenwachstum erfolgte vom Sinusboden aus in die Peripherie des Augmentates entlang des Bio-Oss® Granulats. Es war eine Abnahme der Knochendichte vom Sinusboden hin zur Peripherie zu erkennen (vgl. Abbildung 5).

-

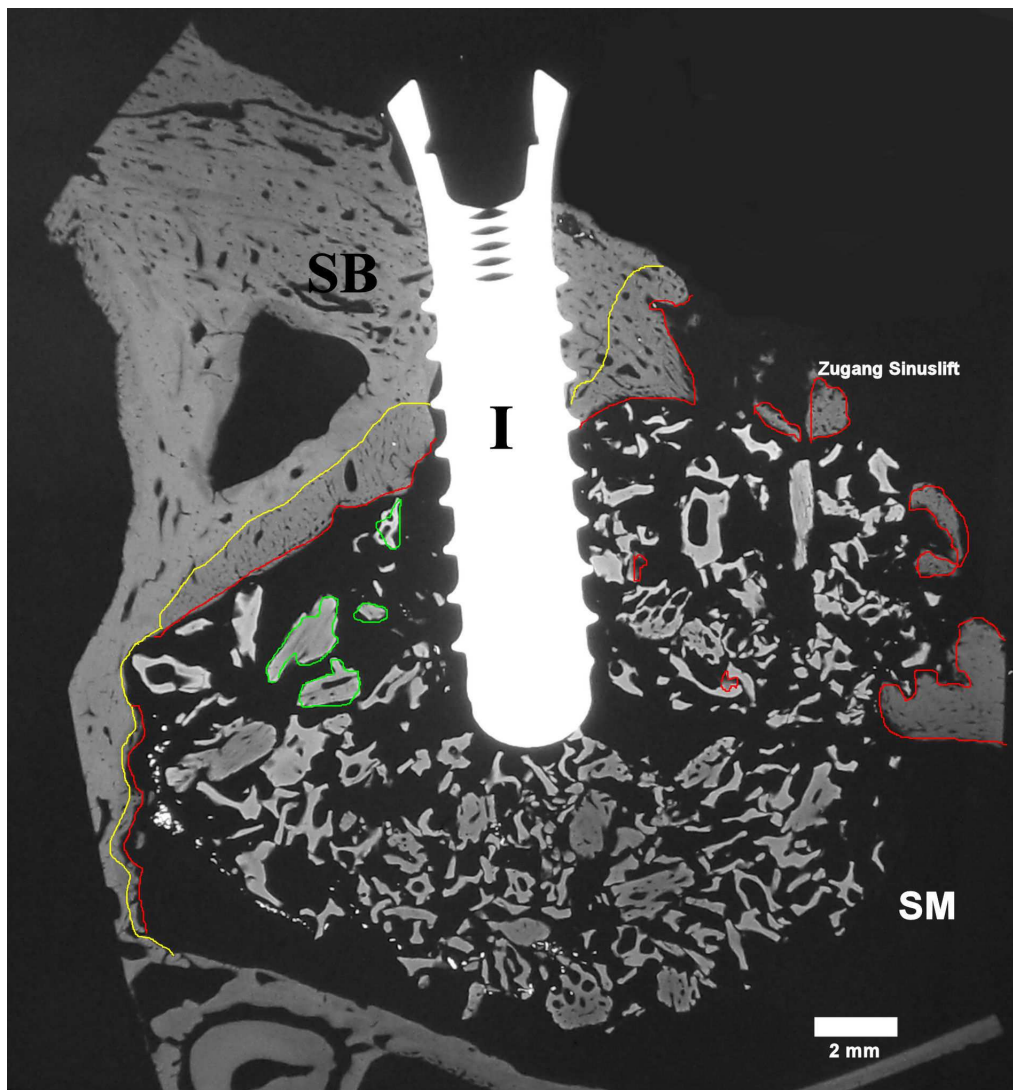


Abbildung 5: Mikroradiographie der Sinusbodenaugmentation der Testseite mit Bio-Oss®, autologen Osteoblasten und PRP mit primärer Insertion eines ITI®-Implantates (I). Die gelbe Linie zeigt den ehemaligen Sinusboden (SB), die rote Linie den neu appositionierten Knochen, welcher durch die geringere Mineralisation dunkelgrau erscheint. Die Bio-Oss® Partikel sind grün markiert. Sinus maxillaris (SM)

Zu erkennen ist das im basalen Drittel von neuem Knochen umhüllte Bio-Oss® Granulat und der Kontakt des Knochens zur Implantatoberfläche (vgl. Abbildung 6 a-c).

Abb. 6a.

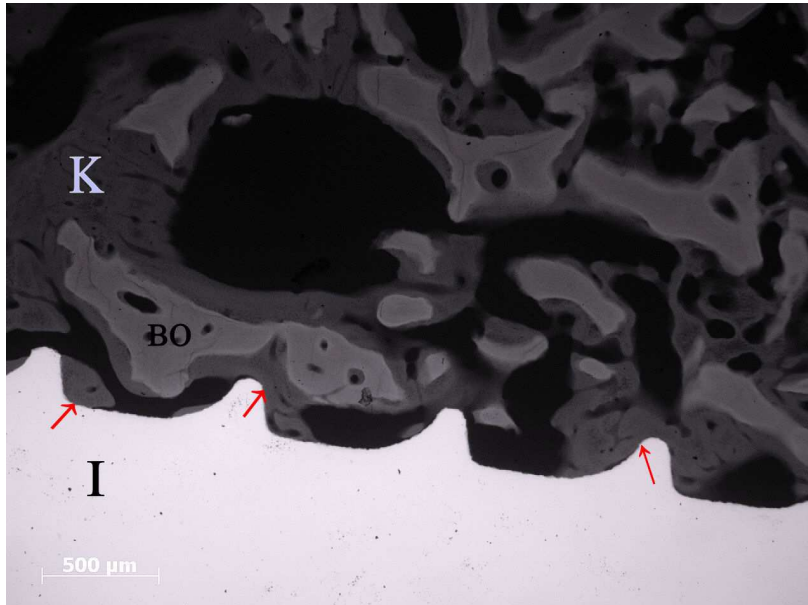


Abb. 6b.

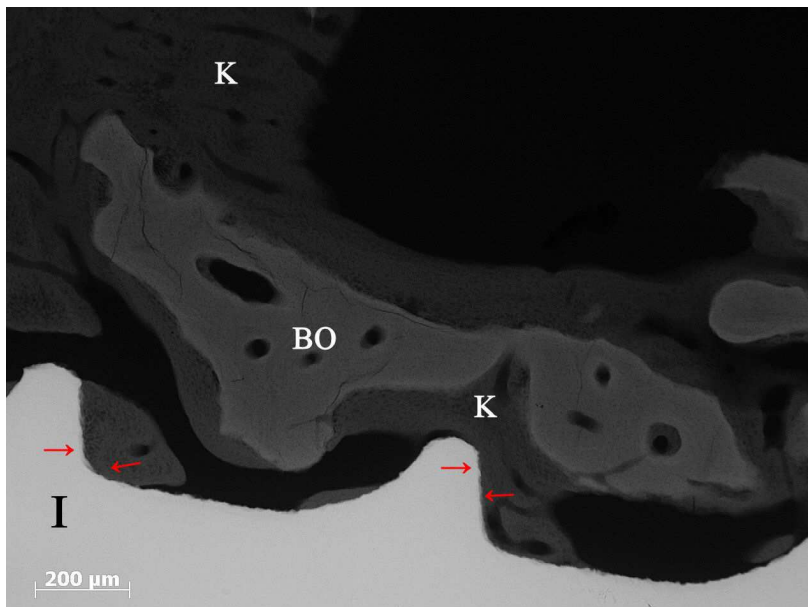


Abb. 6c.

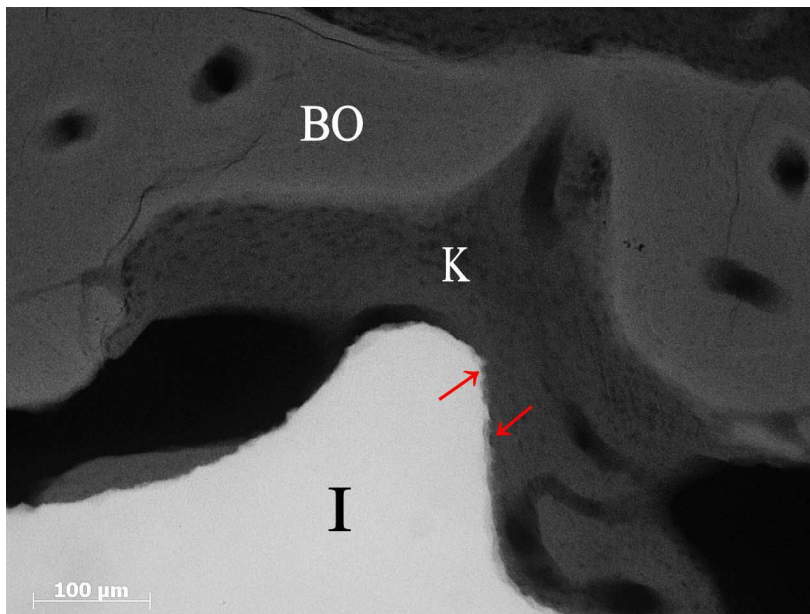


Abbildung 6: Mikroradiographie der Sinusbodenaugmentation der Testseite mit Bio-Oss®, autologen Osteoblasten und PRP mit primärer Insertion eines ITI®-Implantates. In den Abbildungen 6a-c ist in verschiedenen Vergrößerungen der Knochen-Implantat-Kontakt (→) dargestellt. Der neu gebildete Knochen (K) ist durch die geringere Mineralisation (dunkelgrau) zu erkennen, das Bio-Oss® (BO) ist durch die starke Radiopazität (hellgrau) zu erkennen. Implantat (I).

3.5 Fluoreszenzmikroskopie

Anhand der Fluoreszenzmikroskopie war eine zeitliche Auswertung der Knochenapposition möglich. Sowohl auf der Testseite als auch auf der Kontrollseite zeigten sich im Bereich des Sinusbodens verschiedenfarbige Bänder, welche frühzeitigen Knochenanbau innerhalb von fünf Wochen nach der Operation anzeigen (2.Woche gelb, 3. Woche grün, 4. Woche rot, 5.Woche braun, siehe Kap. 2.11). Diese Farbbänder zeigen im basalen Drittel eine Knochenapposition, die das Bio-Oss® überzieht und teilweise bis an das Implantat heranreicht und einen Kontakt zur Implantatoberfläche herstellt (vgl. Abbildung 7). Im peripheren Bereich des Augmentates und an der Implantatspitze kam es zu keiner Apposition von neuem Knochen. Im Vergleich zu der Kontrollseite scheint die Zellbesiedelung des Bio-Oss® auf der Testseite weder zu einer beschleunigten Knochenapposition im peripheren Bereich des Augmentates als im Bereich der Implantatspitze zu führen.

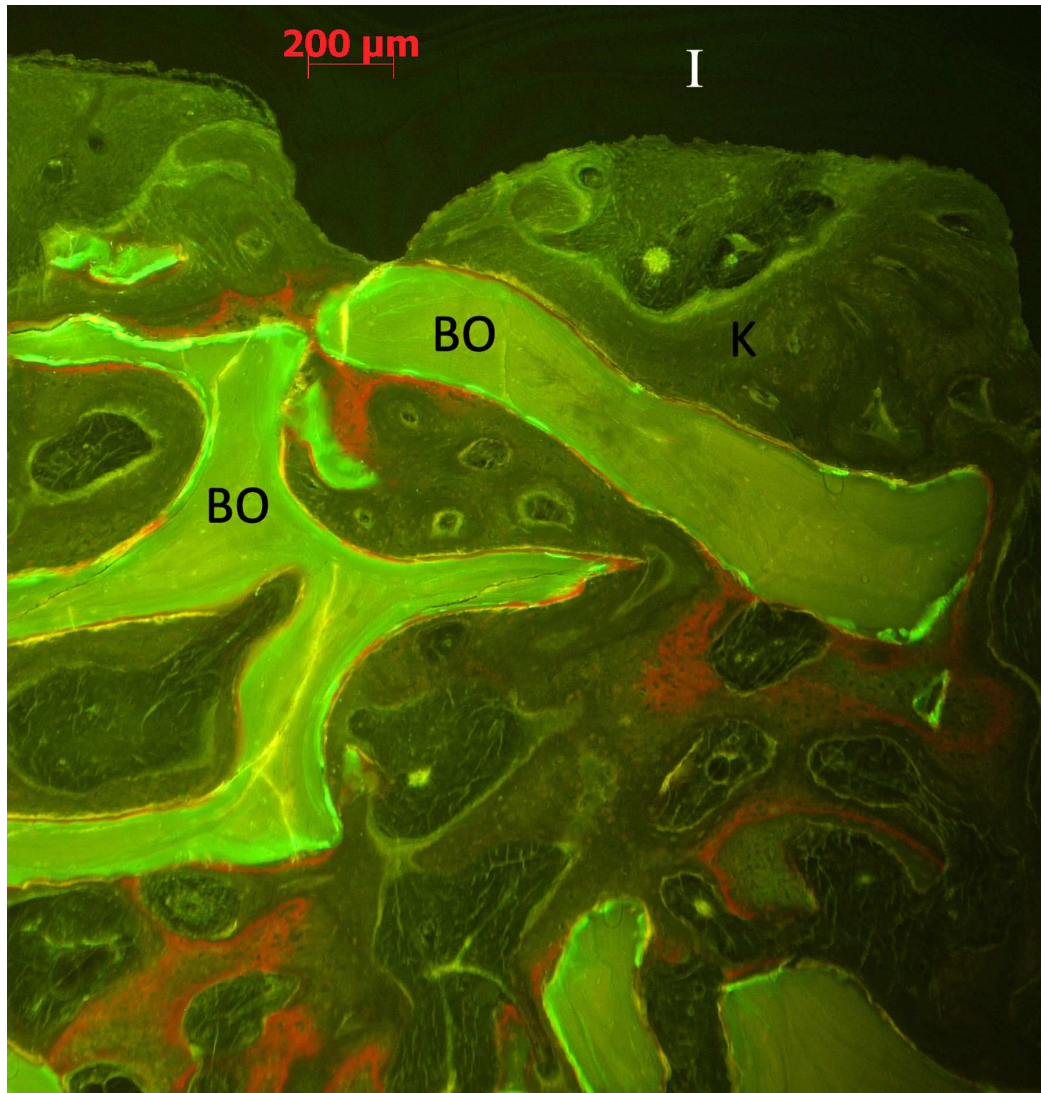


Abbildung 7: Fluoreszenzmikroskopie der Sinusbodenaugmentation der Testseite mit Bio-Oss[®], autologen Osteoblasten und PRP mit primärer Insertion eines ITI[®]-Implantates. Zu erkennen sind das Bio-Oss[®] (BO), das Implantat(I) und der neu gebildete Knochen (K). Die Farbbänder markieren die Knochenapposition ab dem 14.postoperativen Tag: Xylenolorange (gelb), Calceingrün (grün), Alizarinkomplexon (rot), Tetracyclin (braun).

3.6 Toluidinblaufärbung

In den Präparaten der Toluidinblaufärbung waren auf beiden Seiten keine Anzeichen für eine Infektion oder entzündliche Infiltrate zu erkennen. Im Bereich des Sinusbodens war auf beiden Seiten eine Knochenapposition zu erkennen, welche sich ins Augmentat erstreckte (vgl. Abbildung 8). Die Knochendichte nahm jedoch zum Zentrum hin ab, beziehungsweise sie war nicht mehr zu erkennen. Im Bereich des ortsständigen Knochens waren die Bio-Oss[®] Partikel von neu regeneriertem

Knochen umgeben und von Osteoblasten besiedelt, was die guten osteokonduktiven Eigenschaften der Mineralstruktur des Materials zeigte. Der Knochen zeigte hier eine relativ reife Struktur mit lamellärem Aufbau. Am Rand der neuen Knochenapposition sah man im Gegensatz dazu viele aktive Osteoblasten, der Knochen ist dünn und eher geflechtartig.

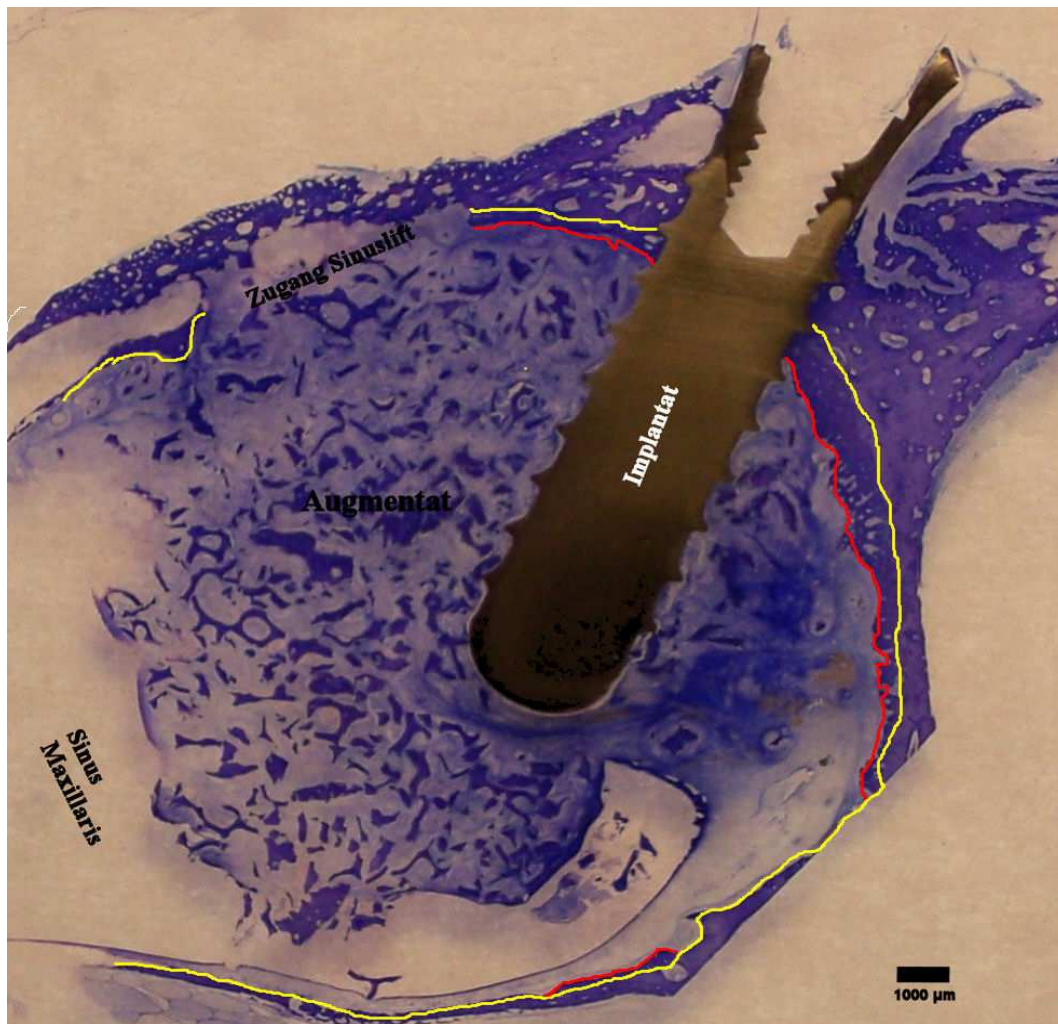


Abbildung 8: Toluidinblaufärbung der Sinusbodenaugmentation der Testseite mit Bio-Oss[®], autologen Osteoblasten und PRP mit primärer Insertion eines ITI[®]-Implantates. Die gelbe Linie zeigt den ehemaligen Sinusboden (SB), die rote Linie den neu appositionierten Knochen, welcher dunkellila erscheint. Die Bio-Oss[®] Partikel sind grün markiert. Sinus maxillaris (SM)

Das Bio-Oss[®] Granulat wies teilweise erhebliche Resorptionslakunen auf oder war fast vollständig abgebaut (vgl. Abbildung 9a). In diesen Bereichen waren mehrzellige Osteoklasen zu erkennen. Diese Zellen bildeten teilweise konzentrische Schichten um die Reste des Bio-Oss[®] Granulats, ähnlich einem Fremdkörpergranuloms.

Umgeben wurden diese Granulome von faserreichem Gewebe, welches von Plasmazellen und Lymphozyten infiltriert war (vgl. Abbildung 10).

Die im Augmentat lokalisierte Implantatoberfläche war auf Test- und Kontrollseite nur sporadisch mit neu regeneriertem Knochen bedeckt. Zu einem Knochen-Implantat-Kontakt kam es am ehesten im Bereich des Sinusbodens (vgl. Abbildung 9a und b). Im Gegensatz dazu war das obere Implantatdrittel im ortsständigen Knochen sehr gut osseointegriert.

Abb. 9a.

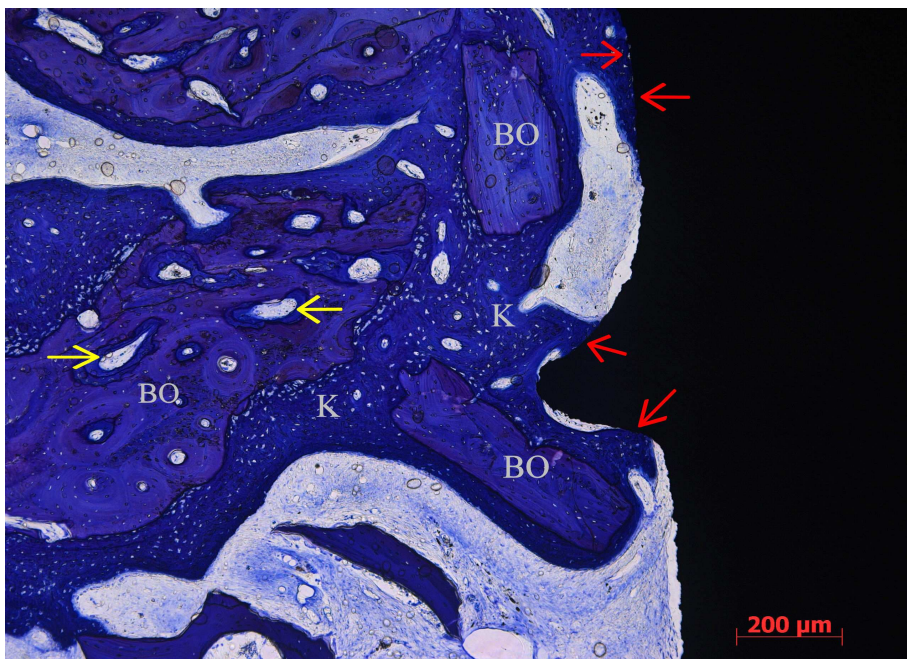


Abb. 9b.

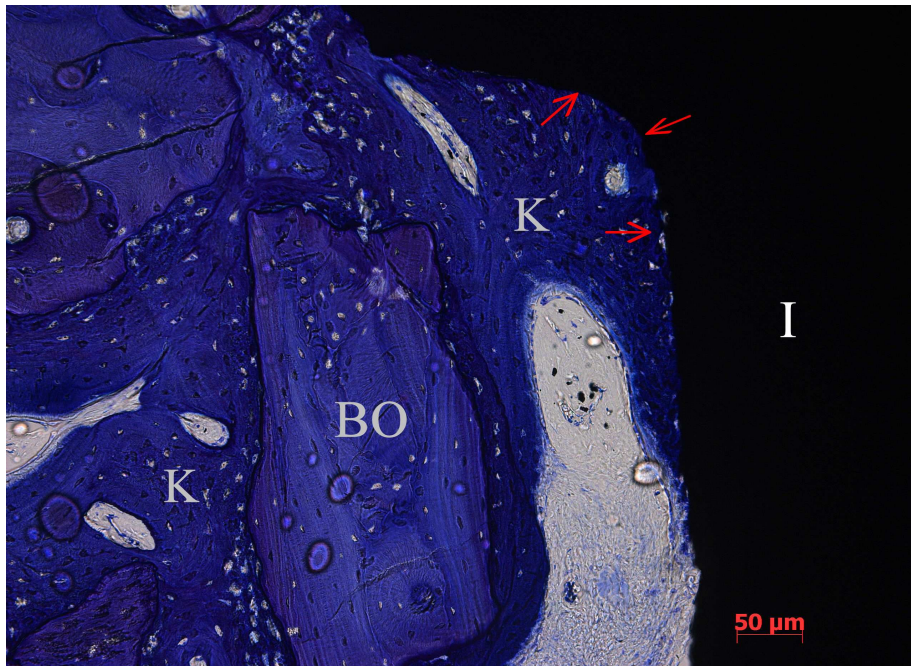


Abbildung 9: Toluidinblaufärbung der Sinusbodenaugmentation der Testseite mit Bio-Oss[®], autologen Osteoblasten und PRP mit primärer Insertion eines ITI[®]-Implantates. In den Abbildungen a und b ist in verschiedenen Vergrößerungen der Knochen-Implantat-Kontakt (→) dargestellt. Der neu gebildete Knochen (K) ist dunkellila gefärbt. Er überzieht das Bio-Oss[®] (BO), welches sich helllila darstellt und das Implantat (I).

In Abb. a. sind im Bio-Oss[®] (BO) Resorptionslakunen mit neuem Knochen zu erkennen (→).

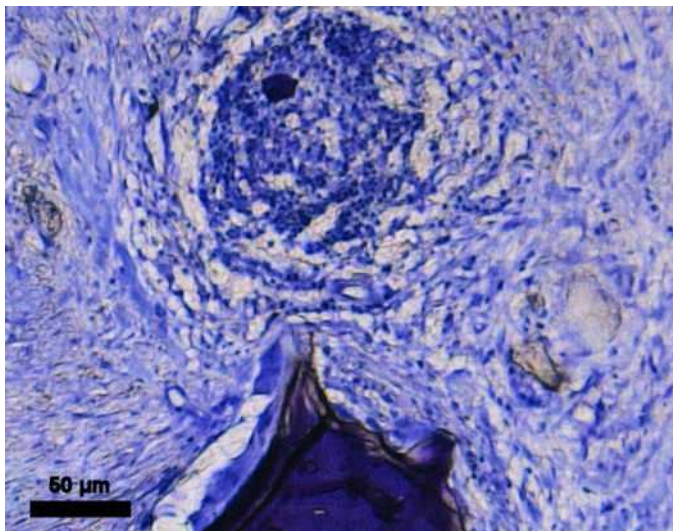
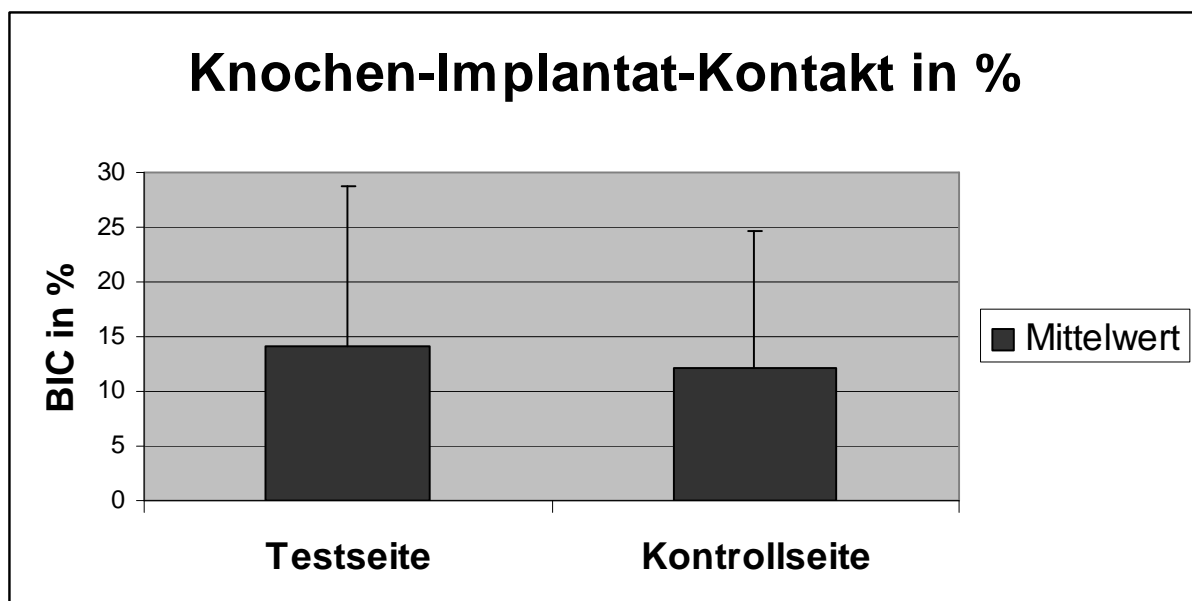


Abbildung 10: Fremdkörpergranulom um Reste des Bio-Oss[®] Granulat, bestehend aus Fasergewebe und mehrkernigen Zellen, infiltriert von Lymphozyten.

3.7 Histomorphometrie

3.7.1 Knochen-Implantat-Kontakt (BIC)

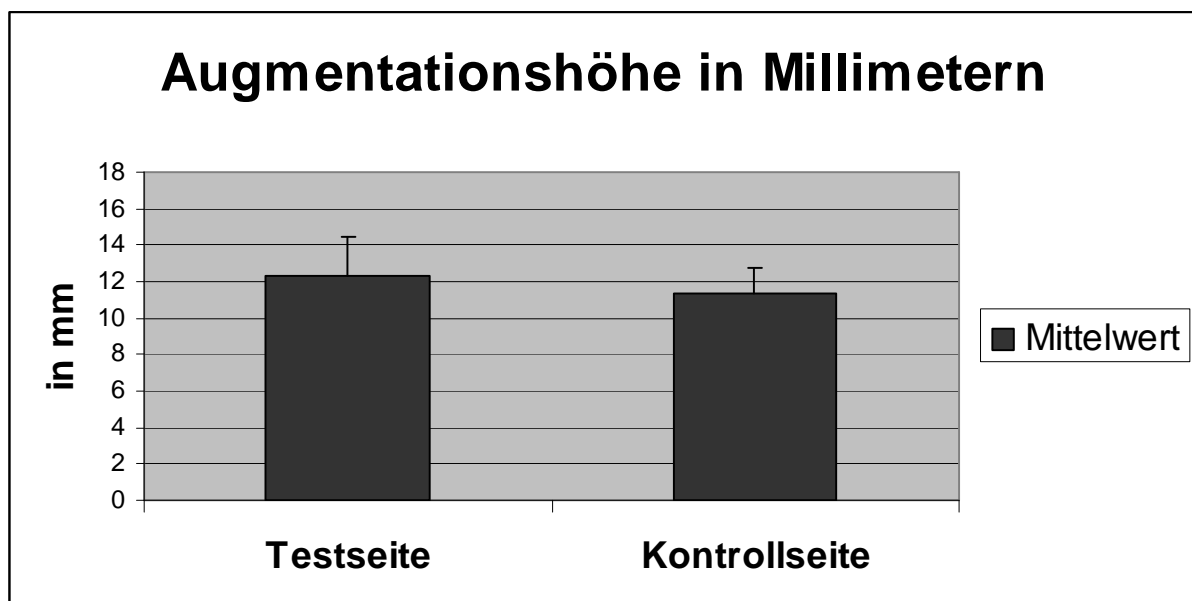
Der Knochen-Implantat-Kontakt zeigte sowohl auf der Kontrollseite als auch in der Testseite starke Schwankungen innerhalb der jeweiligen Gruppe und war sehr gering. Das geringe Ergebnis von Tier 1 war auf einen erheblichen Verlust des Augmentates zurückzuführen (vgl. Tabelle 8 im Anhang). Der Mittelwert auf der Testseite mit Bio-Oss® Granulat, PRP und Zellen lag bei 14,1%. Auf der Kontrollseite mit Bio-Oss® Granulat und PRP lag der Mittelwert bei 12,2% (Grafik 2). Hieraus ergibt sich, dass die Differenz zwischen Kontroll- und Testseite statistisch nicht signifikant war ($p = 0,249$, vgl. Tabelle 7 im Anhang).



Graphik 2: Vergleich des Knochen-Implantat-Kontaktes von Test- und Kontrollseite (Mittelwert und Standardabweichung, $n=6$)

3.7.2 Augmentationshöhe

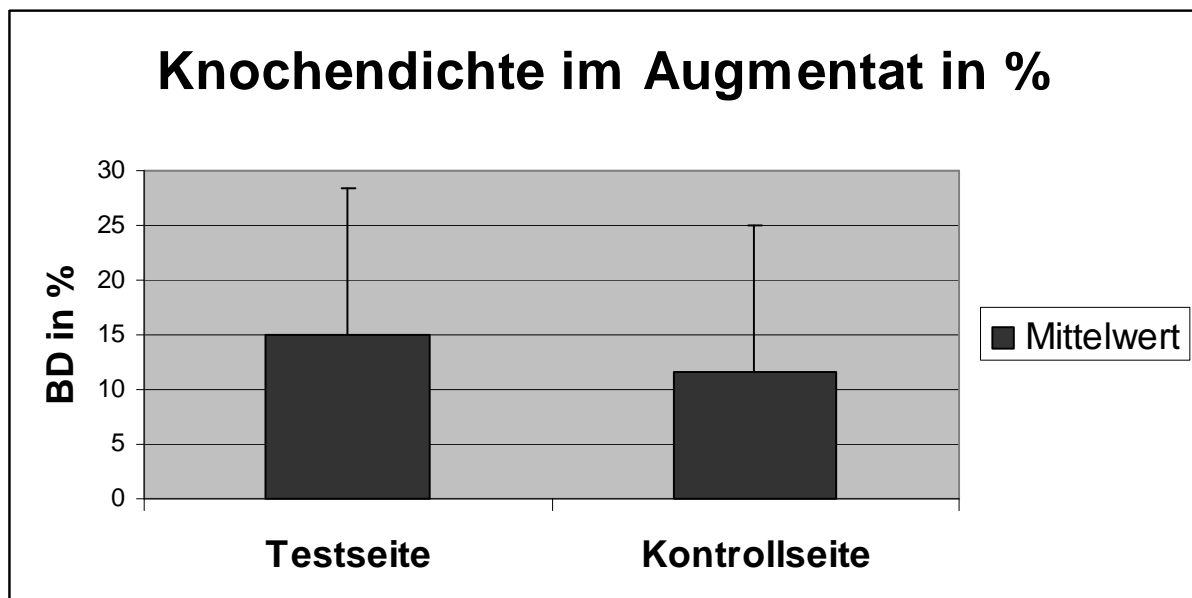
Die Höhe des Augmentates in der Testgruppe mit Zellen lag im Mittelwert bei 12,3 mm. Der Mittelwert der Augmentationshöhe der Kontrollgruppe lag bei 11,4 mm (Grafik 3). Es ergab sich kein statistisch signifikanter Unterschied ($p = 0,461$, vgl. Tabelle 8 im Anhang).



Graphik 3: Vergleich der Augmentationshöhe von Test- und Kontrollseite (Mittelwert und Standardabweichung, $n=6$)

3.7.3 Knochendichte im Augmentat

Die Knochendichte des Augmentates im Bereich des Sinusbodens auf der Testseite mit Bio-Oss® Granulat, PRP und Zellen lag im Mittelwert bei 15,0%. Der Mittelwert der Knochendichte auf der Kontrollseite mit Bio-Oss® Granulat und PRP lag niedriger bei 11,7% (Grafik 4). Diese Differenz war ebenfalls statistisch nicht signifikant ($p = 0,686$, vgl. Tabelle 9 im Anhang). Die einzelnen Werte unterlagen auch hier starken Schwankungen, wobei die geringen Ergebnisse bei Tier 1 erneut auf den Verlust des Augmentates zurückzuführen waren.



Graphik 4: Vergleich der Knochendichte im Augmentat von Test- und Kontrollseite (Mittelwert und Standardabweichung, $n=6$)

4. DISKUSSION

In der vorliegenden Studie wurde bei sechs Göttinger Minischweinen eine Sinusbodenaugmentation mit direkter Implantatinserterion durchgeführt. Hierbei wurde der Effekt von mit Osteoblastenvorläuferzellen besiedeltem Bio-Oss® Spongiosa Granulat unter der Zugabe von PRP zu reinem Bio-Oss® Spongiosa Granulat (ohne Zellen) mit PRP nach sechs Wochen Versuchsdauer auf die Knochenheilung verglichen. Ziel der Sinusbodenaugmentation ist eine vertikale Erhöhung des Knochenangebotes im atrophierten Oberkiefer auf ca. 14 mm. Der neu gebildete Knochen sollte eine homogene Struktur aufweisen und zum inserierten Implantat einen möglichst großen Oberflächenkontakt herstellen.

Der Einheilzeitraum von sechs Wochen wäre ein erheblicher klinischer Fortschritt zur bisher empfohlenen Dauer von sechs Monaten. Die Auswertungen der untersuchten Parameter ergaben keinen statistisch signifikanten Unterschied zwischen Test- und Kontrollseite.

Als Versuchstier wurde das Göttinger Minischwein aus folgenden Gründen ausgewählt: Es besitzt eine dem Menschen ähnlich hohe Gewebedurchblutung, die Knochenapposition von 1,2 µm/Tag ähnelt der des Menschen von 0,9 µm/Tag (Hönig & Merten 1993), der Sinus maxillaris ist pneumatisiert und entspricht in Größe und Form der des Menschen und die Sinusmukosa gleicht in ihrer Dicke und Verletzlichkeit, im Gegensatz zur derben des Hundes, eher der des Menschen (Wetzel et al. 1995). Diese anatomischen und physiologischen Gegebenheiten des Minischweins bilden daher die Voraussetzung für die Übertragbarkeit der Ergebnisse vom Tiermodell zum Menschen (Drommer 1981, Hönig & Merten 1993). Eine intraorale Implantatinserterion in den Alveolarkamm ist durch die Lage der Arterie, der Vene und des Nervus infraorbitalis zwischen Kieferhöhle und Seitenzähnen (Popesko 1979) nicht möglich. Daher erfolgt die Implantatinserterion in die Kieferhöhle und die Sinusbodenaugmentation von extraoral (Terheyden et al. 1999).

4.1 Bewertung des plättchenreichen Plasmas

Bei der Herstellung des plättchenreichen Plasmas wurde versucht, die Thrombozytenkonzentration konstant zu halten. Zur Anwendung kam die von Roldan 2004 statistisch erprobte Methode, welche eine Modifikation des von Marx (Marx et al. 1998) entwickelten Verfahrens darstellt. Der erreichte Mittelwert des Anreicherungsfaktors lag bei 4,08. Die relativ große Variabilität zwischen den Tieren bezüglich der Thrombozytenkonzentration im Vollblut spiegelte sich nach dem Zentrifugieren auch im angereicherten PRP wider (vgl. Tabelle 7 im Anhang). Dies ist kritisch zu sehen, da somit auch der Gehalt an den enthaltenen Wachstumsfaktoren wie PDGF, TGF β und IGF im PRP unterschiedlich einzuschätzen ist. Der Effekt dieser Faktoren ist bei lokaler Applikation jedoch dosisabhängig, was verschiedene Studien belegen (Beck et al. 1993, Ripamonti et al. 1997). Die ideale Thrombozytenkonzentration und somit die ideale Wachstumsfaktorendosis ist bisher unbekannt.

Neben der Thrombozytenkonzentration im Vollblut beeinflussen weitere Faktoren die Herstellung und spätere Wirksamkeit des PRP's. Dazu zählen eine vorzeitige Degranulation der Thrombozyten, eine mögliche Kontamination durch Leukozyten, die Zentrifugationsdauer und Beschleunigung und die Lagerungsbedingungen für Vollblut und PRP (Hönig & Merten 1993, Barradas et al. 1994, Landesberg et al. 2000, Weibrich et al. 2001). Aus den genannten Gründen ergibt sich die Schwierigkeit, experimentell allgemeingültige Daten zu produzieren. Dies verdeutlichen verschiedene experimentelle Studien, die teilweise eine beschleunigte Knochenheilung (Wiltfang et al. 2003, 2004) oder verbesserte Osseointegration zeigen (Furst et al. 2003), eine erhöhte Knochendicht bei zur Kontrollseite gleicher Osseointegration (Roldan et al. 2004b, 2008) oder keinen Vorteil bei der Applikation von PRP (Roldan et al. 2004a). In einer vorangegangenen Studie von Liu, die nach dem gleichen Modell aufgebaut war, bei der jedoch kein PRP zum mit Zellen besiedelten Bio-Oss[®] Granulat gegeben wurde, war ebenfalls kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen Test- und Kontrollseite zu erkennen (Liu et al. 2008). Die Werte der Knochendichte sind nahezu gleich (15,0% vs. 12,3%), der Knochen-Implantat-Kontakt war jedoch ohne PRP höher (14,1% vs. 24,1%). Dies zeigt, dass die Zugabe von PRP in der angewendeten Form keinen Vorteil bringt (Liu, et al. 2008).

4.2 Bewertung der autologen Osteoblasten

In verschiedenen experimentellen Studien wurde am Kleintiermodell die Wirksamkeit von autologen osteogenen Zellen zur Verbesserung und Beschleunigung der Knochenbildung bei der Sinusbodenaugmentation mit Erfolg versprechenden Ergebnissen getestet. Ohya führte an Hasen eine Sinusbodenaugmentation mit BMSCs (bone marrow stromal cells) und PRP im Vergleich zu autologem Knochen und PRP (Ohya et al. 2005) durch, ohne einen signifikanten Unterschied festzustellen, was für das Potential des Tissue Engineering spricht. Pierie zeigte am Minischwein bei beidseitigem Sinuslift eine höhere Knochendichte und einen höheren Knochen-Implantat-Kontakt bei der Verwendung von MSCs (mesenchymal stem cells) PRP und FH (Fluorohydroxylapatit) im Vergleich zu reinem FH (Pieri et al. 2008). Trotz dieser vielversprechenden Ergebnisse zeigt die vorliegende Studie, dass die Knochenneubildung durch das Besiedeln von Bio-Oss[®] Granulat mit Osteoblastenvorläuferzellen und der Zugabe von PRP nicht beschleunigt wird.

Für dieses Ergebnis gibt es mehrere mögliche Gründe. Einer ist das Absterben der Osteoblastenvorläuferzellen nach dem Einbringen in den Sinus maxillaris aufgrund des Fehlens von Nährstoffen und Sauerstoff. Es wird von einem erheblichen Verlust von in vivo transplantierten Osteoblasten aufgrund von einem Mangel an Nährstoffen und Sauerstoff berichtet (Kneser et al. 2006). Im vorliegenden Modell erfolgte die initiale Versorgung der Zellen mit Sauerstoff und Nährstoffen per Diffusion aus der umgebenden Knochenwand. Diese Versorgung ist jedoch nur bis zu einem Umkreis von 200 µm möglich (Goldstein et al. 2001), was sich bei einer durchschnittlichen Augmentathöhe von 12,3 mm negativ auf das Überleben der Zellen auswirken kann. Das Einsprießen von Gefäßen in das Augmentat und somit eine direkte Versorgung der Zellen geht sehr langsam vor sich, was eine Vaskularisierungsrate von 0,09-0,25 mm/Tag bei einem Kaninchen-Modell zeigt (Zawicki et al. 1981). Daher litten die meisten Zellen, mit Ausnahme der im Randbereich des Augmentats, möglicherweise an einer Unterversorgung von Nährstoffen und Sauerstoff, was zum Absterben führte, bevor sie durch einsprießende Gefäße versorgt werden konnten. Dafür spricht das Abnehmen der Knochendichte vom Randbereich zum Zentrum des Augmentates hin.

Ein weiterer möglicher Grund ist der Verlust der Osteogenität, also der Fähigkeit Knochen zu synthetisieren. Dies ist nach mehrmaligem Passagieren in vitro möglich

(Muraglia et al. 2000), in der vorliegen Studie vor der Transplantation aber eher unwahrscheinlich, da sie nur zweimal passagiert wurden und in der Parallelkultur die Osteoblastennatur der Zellen mittels der Marker Osteocalcin, HP und LP nachgewiesen wurden. Eine Kontrolle der Osteogenität nach dem Siedeln der Zellen auf das Bio-Oss® ist jedoch nicht möglich. Ein Verlust der Osteogenität nach dem Einbringen der Zellen in vivo wäre aufgrund des Mangels an Nährstoffen und Sauerstoff möglich, auch falls sie die schwierigen Bedingungen überleben würden. Durch die Zugabe von PRP könnte der Mangel an osteoinduktiven Faktoren im Augmentat ausgeglichen werden. Hier stellt sich die Frage, ob die enthaltenen Wachstumsfaktoren die Osteogenität der Zellen auch ohne vorhandene Nährstoffe anregen können. Hinzu kommen die in 4.1 beschriebenen Probleme beim PRP. Des Weiteren beruht die Knochenregeneration auf einem kontinuierlichen Wechselspiel von Wachstumsfaktoren, Zytokinen und osteogenen Zellen (Robey et al. 1993, Reddi 1998, Lieberman et al. 2002). Wachstumsfaktoren wie die im PRP enthaltenen BMP's können die Differenzierung und Proliferation der osteogenen Zellen beeinflussen (Kneser et al. 2006), die ständige osteogene Funktion der Zellen ist aber von einer kontinuierlichen Förderung dieser Faktoren abhängig (Hu et al. 2005). In der vorliegenden Studie wurde das PRP jedoch nur einmal beim Implantieren der Zellen in die Kieferhöhle appliziert. Weitere Wachstumsfaktoren mussten ebenfalls den Weg der Diffusion gehen und gelangen nicht weit genug in das Augmentat. Daher könnten die Zellen ihre osteogene Funktion verlieren.

Ein weiterer kritischer Punkt ist die Dichte und Anzahl der Zellen auf dem Bio-Oss® Granulat. Die Anzahl und Konzentration der osteogenen Zellen in einem Gerüst ist von entscheidender Bedeutung für die erfolgreiche Knochenbildung in vivo (Hernigou et al. 2005a, b). In der vorliegenden Studie wurden die Zellen eine Woche auf dem Bio-Oss® Granulat kultiviert. In einer vorherigen Studie von Acil wurden die Zellen 6 Wochen auf dem Bio-Oss® Granulat unter den gleichen Bedingungen kultiviert und bildeten hier einen dichten Zellverband (Acil et al. 2000). Möglich ist daher eine zu geringe Zelldichte nach einer Woche, um eine deutliche Verbesserung der Knochendichte zu bewirken.

Zu beachten ist auch die Fremdkörperreaktion im Augmentat mit Bildung von Granulomen um die Reste des Bio-Oss® Granulates. Bio-Oss® ist ein in der Mund-Kiefer-Gesichtschirurgie weit verbreitetes und gut dokumentiertes Knochenersatzmaterial, welches durch die Vorbehandlung antigenfrei ist (vgl. Kapitel

2.3). Bisher sind keine derartigen Fremdkörperreaktionen bei einer Augmentation mit Bio-Oss® bekannt. Durch die Verwendung von autologem Serum statt fetalem Kälberserum bei der Kultivierung der autologen Osteoblasten sollte eine Antigenreaktion auf das mit Zellen besiedelte Bio-Oss® Granulat vermieden werden. Die Quelle für diese Reaktion ist daher unklar, steht aber wahrscheinlich mit dem Prozess der Zellkultivierung im Zusammenhang.

Die unterschiedlichen Ergebnisse der vorliegenden Studie im Vergleich zu der Sinusbodenaugmentation am Hasen-Modell (Ohya et al. 2005), aber auch zur Sinusbodenaugmentation am Minischwein (Pieri et al. 2008), könnten darauf hindeuten, dass die Größe des augmentierten Volumens entscheidend für das Überleben der auf das Knochenersatzmaterial gesiedelten Zellen oder zumindest ihrer osteogenen Funktion ist und dass die Einheilzeit ebenfalls eine Rolle spielt. Das Volumen des Augmentates beim Hasen und somit auch die Diffusionsstrecke für Nährstoffe sind aufgrund der anatomischen Voraussetzungen sicherlich kleiner und Pierie wählte für seine Versuchsdauer 12 Wochen statt der 6 Wochen in der vorliegenden Studie. Zu beachten sind auch ein anderes Kultivierungsverfahren der Zellen und das Besiedeln des FH's einen Tag vor dem Einbringen in den Sinus. Des Weiteren ist die Art des Knochendefekts sicherlich ein weiterer Faktor für die Funktion und das Überleben der implantierten osteogenen Zellen. In Tiermodellen mit segmentalen Knochendefekten in der Mandibula (Schliephake et al. 2001, Abukawa et al. 2004) und anderen Knochen (Petite et al. 2000, Fialkov et al. 2003), alveolären Knochendefekten (Weng et al. 2006) und Defekten der Schädelkalotte (van den Dolder et al. 2003), standen den Zellen Nährstoff, Sauerstoff und auch osteoinduktive Wachstumsfaktoren zur Verfügung um ihr osteogenes Potential auszuschöpfen. Die Defekte mussten manuell geschaffen werden und so stand angefrischter, durchbluteter, spongiöser Knochen als Umgebung zur Verfügung. Demgegenüber liegt das mit osteogenen Zellen besiedelte Bio-Oss® Granulat bei der Sinusbodenaugmentation zwischen der Schleimhaut der Kieferhöhle und der unverletzten Kortikalis des Sinusbodens.

4.3 Osseointegration der Implantate

Der Langzeiterfolg einer Implantatbehandlung ist von einer erfolgreichen Osseointegration, also einem mechanisch festem Verbund zwischen Knochen und Implantat abhängig (Branemark 1983). Als repräsentatives Ergebnis gilt ein Knochen-Implantat-Kontakt von 61,3% nach 6 Monaten am ortsständigen Knochen (Arvidson et al. 1990). Studien, die den Knochen-Implantat-Kontakt nach drei bis sechsmonatiger Versuchsdauer bei einem Sinuslift mit Bio-Oss® beschreiben, zeigen Werte von 27 bis 38% (Hürzeler et al. 1997a, 1997b, Haas et al. 1998b, Terheyden et al. 1999). Es liegen jedoch auch mehrere tierexperimentelle Studien mit einer Versuchsdauer von 6 Wochen und der Verwendung von Bio-Oss® in Kombination mit PRP oder autologen Osteoblasten vor mit Werten von 5,7 bis 24,2% (Roldan et al. 2004a, 2004b, Liu et al. 2008, Roldan et al. 2008). Eine mit MSCs (mesenchymal stem cells) PRP und FH (Fluorohydroxylapatit) durchgeführte Studie mit einer Versuchsdauer von 3 Monaten ergab eine signifikante Erhöhung des Knochen-Implantat-Kontaktes (Pieri et al. 2008). Studien mit einer längeren Einheilphase scheinen jedoch ungeeignet zu sein, da eine langfristige Einheilung von Knochenersatzmaterialien und autologem Knochen aus biologischer oder mechanischer Sicht keine Unterschiede aufweisen (Quinones et al. 1997, Haas et al. 1998a). Ergebnisse über die Osseointegration nach sechs Wochen Einheilzeit bei der Verwendung von Bio-Oss®, PRP und autologen Osteoblasten liegen nicht vor. In der vorliegenden Studie lag der Knochen-Implantat-Kontakt auf der Testseite mit Bio-Oss® Granulat, PRP und autologen Osteoblasten im Mittelwert bei 14,1%, auf der Kontrollseite mit Bio-Oss® Granulat und PRP bei 12,2% (vgl. 3.7.1). Eine leichte Steigerung des Knochen-Implantat-Kontaktes auf der Testseite konnte zwar festgestellt werden, sie ist jedoch statistisch nicht signifikant und die einzelnen Werte unterliegen starken Schwankungen (vgl. Tabelle 7).

4.4 Schlussfolgerung

1. Das Modell war geeignet und die Datengewinnung verlief störungsfrei und führte zu validen Daten
2. Die Hypothese wurde abgelehnt
3. Zusätzliche Maßnahmen wie die Anwendung von angiogenen Faktoren zur Beschleunigung der Angiogenese im augmentierten Bereich und die Anwendung von osteoinduktiven Faktoren wie BMPs könnten möglicherweise helfen, die autologen Osteoblasten zu ernähren bzw. zu aktivieren, damit diese die Knochenregeneration und somit die Osseointegration verbessern und beschleunigen.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Die Sinusbodenaugmentation ist heute Mittel der Wahl, um eine stabile Insertion eines Implantates im atrophierten distalen Oberkiefer zu ermöglichen. Die Hypothese der vorliegenden Studie war, dass in vitro kultivierte autologe Knochenvorläuferzellen zu einer verstärkten Osseointegration eines Implantats und zu einer höheren Knochendichte bei der Sinusbodenaugmentation führen.

Autologe Osteoblastenvorläuferzellen wurden aus einer spongiösen Beckenkammstanze von 6 Minischweinen isoliert und in einem mit autologem Serum ergänzten osteogenen Nährmedium kultiviert. Nach erfolgreicher Bestimmung der osteogenen Marker wurden die Zellen für eine Woche auf Bio-Oss® Granulat angesiedelt. Darauf wurde im Sinus maxillaris durch einen extraoralen Zugang augmentiert und jeweils ein enossales ITI® Implantat inseriert. Die rechte Kieferhöhle erhielt ein Gemisch aus Bio-Oss® Granulat, welches mit Zellen besiedelt war und PRP, in die linke Kieferhöhle wurde ein Bio-Oss® PRP Gemisch inseriert. Eine polychrome Sequenzmarkierung wurde durchgeführt. Nach sechs Wochen wurden die Tiere getötet und die Implantate mit dem umgebenden Gewebe explantiert. Der Knochen-Implantat-Kontakt, die Knochendichte und die Augmentationshöhe wurden anhand der hergestellten Hartschliffpräparate digital histomorphometrisch, mikroradiographisch, fluoreszenzmikroskopisch und histologisch gemessen und qualitativ bewertet.

Die Ergebnisse zeigen auf beiden Seiten vor allem knöcherne Apposition nahe der Sinuswand, was eher auf ein osteokonduktives Wachstum hindeutet und einem osteoinduziertem auf der Testseite widerspricht. Das mit autologen Osteoblasten besiedelte Bio-Oss® und PRP hatte keinen signifikanten Vorteil gegenüber dem zellfreien Bio-Oss® und PRP, was der Knochen-Implantat-Kontakt (14,1% vs. 12,2%, $p=0,249$), die Augmentationshöhe (12,28mm vs. 11,38mm, $p=0,461$) und der Knochendichte im Augmentat (15,0% vs. 11,7%, $p=0,686$) zeigen.

Die autologen Knochenvorläuferzellen konnten trotz des geeigneten Tiermodells somit unter Zugabe von PRP die Osseointegration enossaler Implantate nicht beschleunigen und führten nicht zu einer verbesserten Knochenapposition. Somit unterstützt die vorliegende Studie den Einsatz von autologen Osteoblasten und PRP bei der Sinusbodenaugmentation in der Praxis nicht und die Hypothese wurde abgelehnt.

6. LITERATURVERZEICHNIS

Abukawa, H., Shin, M., Williams, W. B., Vacanti, J. P., Kaban, L. B., Troulis, M. J. (2004) Reconstruction of mandibular defects with autologous tissue-engineered bone. *J Oral Maxillofac Surg* **62**: 601-606.

Acil, Y., Springer, I. N., Broek, V., Terheyden, H., Jepsen, S. (2002) Effects of bone morphogenetic protein-7 stimulation on osteoblasts cultured on different biomaterials. *J Cell Biochem* **86**: 90-98.

Acil, Y., Terheyden, H., Dunsche, A., Fleiner, B., Jepsen, S. (2000) Three-dimensional cultivation of human osteoblast-like cells on highly porous natural bone mineral. *J Biomed Mater Res* **51**: 703-710.

Artzi, Z., Nemcovsky, C. E., Dayan, D. (2002) Bovine-ha spongiosa blocks and immediate implant placement in sinus augmentation procedures. Histopathological and histomorphometric observations on different histological stainings in 10 consecutive patients. *Clin Oral Implants Res* **13**: 420-427.

Arvidson, K., Bystedt, H., Ericsson, I. (1990) Histometric and ultrastructural studies of tissues surrounding astra dental implants in dogs. *Int J Oral Maxillofac Implants* **5**: 127-134.

Balk, S. D. (1971) Calcium as a regulator of the proliferation of normal, but not of transformed, chicken fibroblasts in a plasma-containing medium. *Proc Natl Acad Sci U S A* **68**: 271-275.

Barradas, M. A., Stansby, G., Hamilton, G., Mikhailidis, D. P. (1994) Diminished platelet yield and enhanced platelet aggregability in platelet-rich plasma of peripheral vascular disease patients. *Int Angiol* **13**: 202-207.

Beck, L. S., Amento, E. P., Xu, Y., Deguzman, L., Lee, W. P., Nguyen, T., Gillett, N. A. (1993) Tgf-beta 1 induces bone closure of skull defects: Temporal dynamics of bone formation in defects exposed to rhtgf-beta 1. *J Bone Miner Res* **8**: 753-761.

Behneke, A., Behneke, N., d'Hoedt, B. (2002) A 5-year longitudinal study of the clinical effectiveness of iti solid-screw implants in the treatment of mandibular edentulism. *Int J Oral Maxillofac Implants* **17**: 799-810.

Bereiter, H., Melcher, G. A., Gautier, E., Huggler, A. H. (1991) Erfahrungen mit Bio-Oss®, einem bovinen Apatit, bei verschiedenen klinischen Indikationsbereichen. In Huggler, A. H., Kuner, E. H. (Hrsg.): Aktueller Stand beim Knochenersatz. Hefte zur Unfallheilkunde. Springer, Berlin: 117-126

Blomqvist, J. E., Alberius, P., Isaksson, S. (1996) Retrospective analysis of one-stage maxillary sinus augmentation with endosseous implants. *Int J Oral Maxillofac Implants* **11**: 512-521.

Bohатыртшук, I. (1944) Über Ergebnisse der Mikroröntgenographie. *Acta Radiol* **25**: 351-365.

Boyne, P. J., James, R. A. (1980) Grafting of the maxillary sinus floor with autogenous marrow and bone. *J Oral Surg* **38**: 613-616.

Branemark, P. I. (1983) Osseointegration and its experimental background. *J Prosthet Dent* **50**: 399-410.

Buser, D., Mericske-Stern, R., Bernard, J. P., Behneke, A., Behneke, N., Hirt, H. P., Belser, U. C., Lang, N. P. (1997) Long-term evaluation of non-submerged iti implants. Part 1: 8-year life table analysis of a prospective multi-center study with 2359 implants. *Clin Oral Implants Res* **8**: 161-172.

Buser, D., Nydegger, T., Oxland, T., Cochran, D. L., Schenk, R. K., Hirt, H. P., Snetivy, D., Nolte, L. P. (1999) Interface shear strength of titanium implants with a sandblasted and acid-etched surface: A biomechanical study in the maxilla of miniature pigs. *J Biomed Mater Res* **45**: 75-83.

Celeste, A. J., Iannazzi, J. A., Taylor, R. C., Hewick, R. M., Rosen, V., Wang, E. A., Wozney, J. M. (1990) Identification of transforming growth factor beta family members present in bone-inductive protein purified from bovine bone. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**: 9843-9847.

Cohen, R. E., Mullarky, R. H. (1993) Anorganic bovine bone and bovine bone / collagen composites in regenerative periodontal therapy. *Biol Ther Dent* **9**: 3-4.

Cook, S. D., Salkeld, S. L., Prewett, A. B. (1995) Simian immunodeficiency virus (human hiv-ii) transmission in allograft bone procedures. *Spine* **20**: 1338-1342.

Degidi, M., Artese, L., Rubini, C., Perrotti, V., Iezzi, G., Piattelli, A. (2006) Microvessel density and vascular endothelial growth factor expression in sinus augmentation using bio-oss. *Oral Dis* **12**: 469-475.

Donath, K., Breuner, G. (1982) A method for the study of undecalcified bones and teeth with attached soft tissues. The sage-schliff (sawing and grinding) technique. *J Oral Pathol* **11**: 318-326.

Drommer, R. (1981) Das Göttinger Mini-Pig als Versuchstier in der experimentellen Chirurgie des Mittelgesichts. *Dtsch Z Mund Kiefer Gesichts Chir* **5**: 358-360.

Fennis, J. P., Stoelinga, P. J., Jansen, J. A. (2002) Mandibular reconstruction: A clinical and radiographic animal study on the use of autogenous scaffolds and platelet-rich plasma. *Int J Oral Maxillofac Surg* **31**: 281-286.

Fialkov, J. A., Holy, C. E., Shoichet, M. S., Davies, J. E. (2003) In vivo bone engineering in a rabbit femur. *J Craniofac Surg* **14**: 324-332.

Froum, S. J., Wallace, S. S., Elan, N., Cho, S. C., Tarnow, D. P. (2006) Comparison of mineralized cancellous bone allograft (puros) and anorganic bovine bone matrix (bio-oss) for sinus augmentation: Histomorphometry at 26 to 32 weeks after grafting. *Int J Periodontics Restorative Dent* **26**: 543-551.

- Furst, G., Gruber, R., Tangl, S., Zechner, W., Haas, R., Mailath, G., Sanroman, F., Watzek, G. (2003)** Sinus grafting with autogenous platelet-rich plasma and bovine hydroxyapatite. A histomorphometric study in minipigs. *Clin Oral Implants Res* **14**: 500-508.
- Goldstein, A. S., Juarez, T. M., Helmke, C. D., Gustin, M. C., Mikos, A. G. (2001)** Effect of convection on osteoblastic cell growth and function in biodegradable polymer foam scaffolds. *Biomaterials* **22**: 1279-1288.
- Graham, A. (1998)** The use of growth factors in the clinical practice. *J wound Care* **7**: 536-540.
- Haas, R., Baron, M., Donath, K., Zechner, W., Watzek, G. (2002)** Porous hydroxyapatite for grafting the maxillary sinus: A comparative histomorphometric study in sheep. *Int J Oral Maxillofac Implants* **17**: 337-346.
- Haas, R., Donath, K., Födinger, M., Watzek, G. (1998a)** Bovine hydroxyapatite for maxillary sinus grafting: Comparative histomorphometric findings in sheep. *Clin Oral Implants Res* **9**: 107-116.
- Haas, R., Mailath, G., Dörtbudak, O., Watzek, G. (1998b)** Bovine hydroxyapatite for maxillary sinus augmentation: Analysis of interfacial bond strength of dental implants using pull-out tests. *Clin Oral Implants Res* **9**: 117-122.
- Hernigou, P., Poignard, A., Beaujean, F., Rouard, H. (2005a)** Percutaneous autologous bone-marrow grafting for nonunions. Influence of the number and concentration of progenitor cells. *J Bone Joint Surg Am* **87**: 1430-1437.
- Hernigou, P., Poignard, A., Manicom, O., Mathieu, G., Rouard, H. (2005b)** The use of percutaneous autologous bone marrow transplantation in nonunion and avascular necrosis of bone. *J Bone Joint Surg Br* **87**: 896-902.
- Hirsch, J. M., Ericsson, I. (1991)** Maxillary sinus augmentation using mandibular bone grafts and simultaneous installation of implants. A surgical technique. *Clin Oral Implants Res* **2**: 91-96.
- Hirschfeld, L., Wasserman, B. (1978)** A long-term survey of tooth loss in 600 treated periodontal patients. *J Periodontol* **49**: 225-237.
- Hönig, J. F., Merten, H. A. (1993)** Das Göttinger Miniaturschwein (GMS) als Versuchstier in der human-medizinischen osteologischen Grundlagenforschung. *Z Zahnärztl. Implantol* **2**: 244-254
- Hotz, G., Herr, G. (1994)** Bone substitute with osteoinductive biomaterials--current and future clinical applications. *Int J Oral Maxillofac Surg* **23**: 413-417.
- Hu, Z., Peel, S. A., Ho, S. K., Sandor, G. K., Clokie, C. M. (2005)** Role of bovine bone morphogenetic proteins in bone matrix protein and osteoblast-related gene expression during rat bone marrow stromal cell differentiation. *J Craniofac Surg* **16**: 1006-1014.

- Hürzeler, M. B., Kirsch, A., Ackermann, K. L., Quinones, C. R. (1996)** Reconstruction of the severely resorbed maxilla with dental implants in the augmented maxillary sinus: A 5-year clinical investigation. *Int J Oral Maxillofac Implants* **11**: 466-475.
- Hürzeler, M. B., Quinones, C. R., Kirsch, A., Gloker, C., Schüpbach, P., Strub, J. R., Caffesse, R. G. (1997a)** Maxillary sinus augmentation using different grafting materials and dental implants in monkeys. Part i. Evaluation of anorganic bovine-derived bone matrix. *Clin Oral Implants Res* **8**: 476-486.
- Hürzeler, M. B., Quinones, C. R., Kirsch, A., Schüpbach, P., Krausse, A., Strub, J. R., Caffesse, R. G. (1997b)** Maxillary sinus augmentation using different grafting materials and dental implants in monkeys. Part iii. Evaluation of autogenous bone combined with porous hydroxyapatite. *Clin Oral Implants Res* **8**: 401-411.
- Karlsson, S. (1989)** Failures and length of service in fixed prosthodontics after long-term function. A longitudinal clinical study. *Swed Dent J* **13**: 185-192.
- Kim, Y. K., Yun, P. Y., Kim, S. G., Lim, S. C. (2008)** Analysis of the healing process in sinus bone grafting using various grafting materials. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*.
- Kneser, U., Schaefer, D. J., Polykandriotis, E., Horch, R. E. (2006)** Tissue engineering of bone: The reconstructive surgeon's point of view. *J Cell Mol Med* **10**: 7-19.
- Kübler, N., Reuther, J., Kirchner, T., Priessnitz, B., Sebald, W. (1993)** Osteoinductive, morphologic, and biomechanical properties of autolyzed, antigen-extracted, allogeneic human bone. *J Oral Maxillofac Surg* **51**: 1346-1357.
- Kübler, N. R., Will, C., Depprich, R., Betz, T., Reinhart, E., Bill, J. S., Reuther, J. F. (1999)** Comparative studies of sinus floor elevation with autologous or allogeneic bone tissue. *Mund Kiefer Gesichtschir* **3 Suppl 1**: S53-60.
- Landesberg, R., Roy, M., Glickman, R. S. (2000)** Quantification of growth factor levels using a simplified method of platelet-rich plasma gel preparation. *J Oral Maxillofac Surg* **58**: 297-300; discussion 300-291.
- Lee, H. J., Choi, B. H., Jung, J. H., Zhu, S. J., Lee, S. H., Huh, J. Y., You, T. M., Li, J. (2007)** Maxillary sinus floor augmentation using autogenous bone grafts and platelet-enriched fibrin glue with simultaneous implant placement. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* **103**: 329-333.
- Lieberman, J. R., Daluiski, A., Einhorn, T. A. (2002)** The role of growth factors in the repair of bone. Biology and clinical applications. *J Bone Joint Surg Am* **84-A**: 1032-1044.
- Limat, A., French, L. E. (1999)** Therapy with growth factors. *Curr Probl Dermatol* **27**: 49-56.

Liu, Y., Springer, I. N., Zimmermann, C. E., Acil, Y., Scholz-Arens, K., Wiltfang, J., Terheyden, H. (2008) Missing osteogenic effect of expanded autogenous osteoblast-like cells in a minipig model of sinus augmentation with simultaneous dental implant installation. *Clin Oral Implants Res* **19**: 497-504.

Lorenzetti, M., Mozzati, M., Campanino, P. P., Valente, G. (1998) Bone augmentation of the inferior floor of the maxillary sinus with autogenous bone or composite bone grafts: A histologic-histomorphometric preliminary report. *Int J Oral Maxillofac Implants* **13**: 69-76.

Lundgren, S., Moy, P., Johansson, C., Nilsson, H. (1996) Augmentation of the maxillary sinus floor with particulated mandible: A histologic and histomorphometric study. *Int J Oral Maxillofac Implants* **11**: 760-766.

Lundgren, S., Rasmusson, L., Sjostrom, M., Sennerby, L. (1999) Simultaneous or delayed placement of titanium implants in free autogenous iliac bone grafts. Histological analysis of the bone graft-titanium interface in 10 consecutive patients. *Int J Oral Maxillofac Surg* **28**: 31-37.

Lynch, S. E.: Introduction in: Lynch, S. E., Genco, G. J., Marx, R. E. (1999) Tissue engineering. Application in maxillofacial surgery and periodontics. *Quintessen, Chicago*: 11-18.

Mao, J. J., Giannobile, W. V., Helms, J. A., Hollister, S. J., Krebsbach, P. H., Longaker, M. T., Shi, S. (2006) Craniofacial tissue engineering by stem cells. *J Dent Res* **85**: 966-979.

Marx, R. E., Carlson, E. R., Eichstaedt, R. M., Schimmele, S. R., Strauss, J. E., Georgeff, K. R. (1998) Platelet-rich plasma: Growth factor enhancement for bone grafts. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* **85**: 638-646.

McCarthy, T. L., Ji, C., Centrella, M. (2000) Links among growth factors, hormones, and nuclear factors with essential roles in bone formation. *Crit Rev Oral Biol Med* **11**: 409-422.

Miyazono, K., Takaku, F. (1989) Platelet-derived growth factors. *Blood Rev* **3**: 269-276.

Moy, P. K., Lundgren, S., Holmes, R. E. (1993) Maxillary sinus augmentation: Histomorphometric analysis of graft materials for maxillary sinus floor augmentation. *J Oral Maxillofac Surg* **51**: 857-862.

Muraglia, A., Cancedda, R., Quarto, R. (2000) Clonal mesenchymal progenitors from human bone marrow differentiate in vitro according to a hierarchical model. *J Cell Sci* **113 (Pt 7)**: 1161-1166.

Nanu, A., Taneja, N., Sood, S. K. (1980) Preparation and standardisation of platelet rich plasma and platelet concentrates in a developing blood bank. *Indian J Med Res* **71**: 661-667.

Nasr, H. F., Aichelmann-Reidy, M. E., Yukna, R. A. (1999) Bone and bone substitutes. *Periodontol* **2000** **19**: 74-86.

Nkenke, E., Weisbach, V., Winckler, E., Kessler, P., Schultze-Mosgau, S., Wiltfang, J., Neukam, F. W. (2004) Morbidity of harvesting of bone grafts from the iliac crest for preprosthetic augmentation procedures: A prospective study. *Int J Oral Maxillofac Surg* **33**: 157-163.

Noda, M., Camilliere, J. J. (1989) In vivo stimulation of bone formation by transforming growth factor-beta. *Endocrinology* **124**: 2991-2994.

Ohya, M., Yamada, Y., Ozawa, R., Ito, K., Takahashi, M., Ueda, M. (2005) Sinus floor elevation applied tissue-engineered bone. Comparative study between mesenchymal stem cells/platelet-rich plasma (prp) and autogenous bone with prp complexes in rabbits. *Clin Oral Implants Res* **16**: 622-629.

Paul, C., Schlickewei, W., Kuner, E. H., Schenk, R. K. (1993) Bovines Apatit - Wertigkeit beim Knochenersatz. In: Pesch, H. J., Stöss, H. Kummer, B. :Osteologie aktuell. *Springer, Berlin*: 288-291.

Petite, H., Viateau, V., Bensaid, W., Meunier, A., de Pollak, C., Bourguignon, M., Oudina, K., Sedel, L., Guillemain, G. (2000) Tissue-engineered bone regeneration. *Nat Biotechnol* **18**: 959-963.

Piattelli, M., Favero, G. A., Scarano, A., Orsini, G., Piattelli, A. (1999) Bone reactions to anorganic bovine bone (bio-oss) used in sinus augmentation procedures: A histologic long-term report of 20 cases in humans. *Int J Oral Maxillofac Implants* **14**: 835-840.

Pieri, F., Lucarelli, E., Corinaldesi, G., Iezzi, G., Piattelli, A., Giardino, R., Bassi, M., Donati, D., Marchetti, C. (2008) Mesenchymal stem cells and platelet-rich plasma enhance bone formation in sinus grafting: A histomorphometric study in minipigs. *J Clin Periodontol* **35**: 539-546.

Popesko, P. (1979) Atlas der topographischen Anatomie der Haustiere Bd. 1 (Kopf und Hals). *Enke, Stuttgart*.

Quinones, C. R., Hürzeler, M. B., Schupbach, P., Kirsch, A., Blum, P., Caffesse, R. G., Strub, J. R. (1997) Maxillary sinus augmentation using different grafting materials and osseointegrated dental implants in monkeys. Part ii. Evaluation of porous hydroxyapatite as a grafting material. *Clin Oral Implants Res* **8**: 487-496.

Raghoobar, G. M., Timmenga, N. M., Reintsema, H., Stegenga, B., Vissink, A. (2001) Maxillary bone grafting for insertion of endosseous implants: Results after 12-124 months. *Clin Oral Implants Res* **12**: 279-286.

Raghoobar, G. M., Vissink, A., Reintsema, H., Batenburg, R. H. (1997) Bone grafting of the floor of the maxillary sinus for the placement of endosseous implants. *Br J Oral Maxillofac Surg* **35**: 119-125.

Rahn, B. A. (1976) Die polychrome Fluoreszenzmarkierung des Knochenanbaues. *Zeiss Informationen* **2**: 36-40

Reddi, A. H. (1998) Initiation of fracture repair by bone morphogenetic proteins. *Clin Orthop Relat Res*: S66-72.

- Ripamonti, U., Duneas, N., Van Den Heever, B., Bosch, C., Crooks, J. (1997)** Recombinant transforming growth factor-beta1 induces endochondral bone in the baboon and synergizes with recombinant osteogenic protein-1 (bone morphogenetic protein-7) to initiate rapid bone formation. *J Bone Miner Res* **12**: 1584-1595.
- Robey, P. G., Fedarko, N. S., Hefferan, T. E., Bianco, P., Vetter, U. K., Grzesik, W., Friedenstein, A., Van der Pluijm, G., Mintz, K. P., Young, M. F., et al. (1993)** Structure and molecular regulation of bone matrix proteins. *J Bone Miner Res* **8 Suppl 2**: S483-487.
- Roldan, J. C., Jepsen, S., Miller, J., Freitag, S., Rueger, D. C., Acil, Y., Terheyden, H. (2004a)** Bone formation in the presence of platelet-rich plasma vs. Bone morphogenetic protein-7. *Bone* **34**: 80-90.
- Roldan, J. C., Jepsen, S., Schmidt, C., Knuppel, H., Rueger, D. C., Acil, Y., Terheyden, H. (2004b)** Sinus floor augmentation with simultaneous placement of dental implants in the presence of platelet-rich plasma or recombinant human bone morphogenetic protein-7. *Clin Oral Implants Res* **15**: 716-723.
- Roldan, J. C., Knueppel, H., Schmidt, C., Jepsen, S., Zimmermann, C., Terheyden, H. (2008)** Single-stage sinus augmentation with cancellous iliac bone and anorganic bovine bone in the presence of platelet-rich plasma in the miniature pig. *Clin Oral Implants Res* **19**: 373-378.
- Schliephake, H., Knebel, J. W., Aufderheide, M., Tauscher, M. (2001)** Use of cultivated osteoprogenitor cells to increase bone formation in segmental mandibular defects: An experimental pilot study in sheep. *Int J Oral Maxillofac Surg* **30**: 531-537.
- Schliephake, H., Neukam, F. W., Wichmann, M. (1997)** Survival analysis of endosseous implants in bone grafts used for the treatment of severe alveolar ridge atrophy. *J Oral Maxillofac Surg* **55**: 1227-1233; discussion 1233-1224.
- Schroeder, A., Pohler, O., Sutter, F. (1976)** [tissue reaction to an implant of a titanium hollow cylinder with a titanium surface spray layer]. *SSO Schweiz Monatsschr Zahnheilkd* **86**: 713-727.
- Stover, E. P., Siegel, L. C., Hood, P. A., O'Riordan, G. E., McKenna, T. R. (2000)** Platelet-rich plasma sequestration, with therapeutic platelet yields, reduces allogeneic transfusion in complex cardiac surgery. *Anesth Analg* **90**: 509-516.
- Strub, J. R., Linter, H., Marinello, C. P. (1989)** Rehabilitation of partially edentulous patients using cantilever bridges: A retrospective study. *Int J Periodontics Restorative Dent* **9**: 364-375.
- Stürmer, K. M. (1979)** Mikroradiographie des Knochens, Technik, Aussagekraft und Planimetrie. *Unfallheilk* **148**: 247-251.
- Tallgren, A. (1972)** The continuing reduction of the residual alveolar ridges in complete denture wearers: A mixed-longitudinal study covering 25 years. *J Prosthet Dent* **27**: 120-132.
- Tatum, H., Jr. (1986)** Maxillary and sinus implant reconstructions. *Dent Clin North Am* **30**: 207-229.

- Terheyden, H., Jepsen, S., Moller, B., Tucker, M. M., Rueger, D. C. (1999)** Sinus floor augmentation with simultaneous placement of dental implants using a combination of deproteinized bone xenografts and recombinant human osteogenic protein-1. A histometric study in miniature pigs. *Clin Oral Implants Res* **10**: 510-521.
- Terheyden, H., Jepsen, S., Vogeler, S., Tucker, M., Rueger, D. C. (1997)** Recombinant human osteogenic protein 1 in the rat mandibular augmentation model: Differences in morphology of the newly formed bone are dependent on the type of carrier. *Mund Kiefer Gesichtschir* **1**: 272-275.
- Tidwell, J. K., Blijdorp, P. A., Stoelinga, P. J., Brouns, J. B., Hinderks, F. (1992)** Composite grafting of the maxillary sinus for placement of endosteal implants. A preliminary report of 48 patients. *Int J Oral Maxillofac Surg* **21**: 204-209.
- Triplett, R. G., Schow, S. R. (1996)** Autologous bone grafts and endosseous implants: Complementary techniques. *J Oral Maxillofac Surg* **54**: 486-494.
- Valentini, P., Abensur, D., Densari, D., Graziani, J. N., Hammerle, C. (1998)** Histological evaluation of bio-oss in a 2-stage sinus floor elevation and implantation procedure. A human case report. *Clin Oral Implants Res* **9**: 59-64.
- van den Bergh, J. P., ten Bruggenkate, C. M., Groeneveld, H. H., Burger, E. H., Tuinzing, D. B. (2000)** Recombinant human bone morphogenetic protein-7 in maxillary sinus floor elevation surgery in 3 patients compared to autogenous bone grafts. A clinical pilot study. *J Clin Periodontol* **27**: 627-636.
- van den Dolder, J., Farber, E., Spauwen, P. H., Jansen, J. A. (2003)** Bone tissue reconstruction using titanium fiber mesh combined with rat bone marrow stromal cells. *Biomaterials* **24**: 1745-1750.
- Weibrich, G., Kleis, W. K., Kunz-Kostomanolakis, M., Loos, A. H., Wagner, W. (2001)** Correlation of platelet concentration in platelet-rich plasma to the extraction method, age, sex, and platelet count of the donor. *Int J Oral Maxillofac Implants* **16**: 693-699.
- Weng, Y., Wang, M., Liu, W., Hu, X., Chai, G., Yan, Q., Zhu, L., Cui, L., Cao, Y. (2006)** Repair of experimental alveolar bone defects by tissue-engineered bone. *Tissue Eng* **12**: 1503-1513.
- Wetzel, A. C., Stich, H., Caffesse, R. G. (1995)** Bone apposition onto oral implants in the sinus area filled with different grafting materials. A histological study in beagle dogs. *Clin Oral Implants Res* **6**: 155-163.
- Whitman, D. H., Berry, R. L., Green, D. M. (1997)** Platelet gel: An autologous alternative to fibrin glue with applications in oral and maxillofacial surgery. *J Oral Maxillofac Surg* **55**: 1294-1299.
- Wiltfang, J., Kloss, F. R., Kessler, P., Nkenke, E., Schultze-Mosgau, S., Zimmermann, R., Schlegel, K. A. (2004)** Effects of platelet-rich plasma on bone healing in combination with autogenous bone and bone substitutes in critical-size defects. An animal experiment. *Clin Oral Implants Res* **15**: 187-193.

Wiltfang, J., Schlegel, K. A., Schultze-Mosgau, S., Nkenke, E., Zimmermann, R., Kessler, P. (2003) Sinus floor augmentation with beta-tricalciumphosphate (beta-tcp): Does platelet-rich plasma promote its osseous integration and degradation? *Clin Oral Implants Res* **14**: 213-218.

Winn, S. R., Uludag, H., Hollinger, J. O. (1999) Carrier systems for bone morphogenetic proteins. *Clin Orthop Relat Res*: S95-106.

Yildirim, M., Spiekermann, H., Handt, S., Edelhoff, D. (2001) Maxillary sinus augmentation with the xenograft bio-oss and autogenous intraoral bone for qualitative improvement of the implant site: A histologic and histomorphometric clinical study in humans. *Int J Oral Maxillofac Implants* **16**: 23-33.

You, T. M., Choi, B. H., Zhu, S. J., Jung, J. H., Lee, S. H., Huh, J. Y., Lee, H. J., Li, J. (2007) Platelet-enriched fibrin glue and platelet-rich plasma in the repair of bone defects adjacent to titanium dental implants. *Int J Oral Maxillofac Implants* **22**: 417-422.

Zawicki, D. F., Jain, R. K., Schmid-Schoenbein, G. W., Chien, S. (1981) Dynamics of neovascularization in normal tissue. *Microvasc Res* **21**: 27-47.

Zhu, S. J., Choi, B. H., Jung, J. H., Lee, S. H., Huh, J. Y., You, T. M., Lee, H. J., Li, J. (2006) A comparative histologic analysis of tissue-engineered bone using platelet-rich plasma and platelet-enriched fibrin glue. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* **102**: 175-179.

7. ANHANG

Tier	Thrombozyten im Vollblut (x1000/dl)	Thrombozyten im PRP (x1000/dl)	Anreicherungs-faktor
1	260	1153	4,43
2	264	721	2,73
3	258	971	3,76
4	288	1020	3,54
5	224	1217	5,43
6	303	1387	4,57
Maximum	303	1387	2,73
Minimum	224	721	5,43
Mittelwert	266	1078	4,08
Median	262	1087	4,10
STABW	27,27942	229,21118	0,93825

Tabelle 6: Statistik der Thrombozytenzählung im Vollblut und im plättchenreichen Plasma

Tier	Kontrollseite: Bio-Oss® + PRP	Testseite: Bio-Oss® + PRP + Zellen
1	0,0 %	2,7 %
2	26,7 %	15,0 %
3	5,6 %	7,8 %
4	29,2 %	42,9 %
5	7,0 %	7,9 %
6	4,6 %	7,9 %
Maximum	29,2 %	42,9 %
Minimum	0,0 %	2,7 %
Mittelwert	12,2 %	14,0 %
Median	6,3 %	7,9 %
STABW	12,44819	14,647

Tabelle 7: Statistik des Knochen – Implantat – Kontaktes (BIC)

Nach Wilcoxon-Analyse war die Differenz des BIC von Test- und Kontrollseite statistisch nicht signifikant (**p = 0,249**)

Tier	Kontrollseite: Bio-Oss® + PRP	Testseite: Bio-Oss® + PRP + Zellen
1	9,95 mm	11,17 mm
2	10,14 mm	14,44 mm
3	12,69 mm	14,50 mm
4	10,62 mm	10,83 mm
5	13,26 mm	9,21 mm
6	11,59 mm	13,53 mm
Maximum	13,26 mm	14,50 mm
Minimum	9,95 mm	9,21 mm
Mittelwert	11,38 mm	12,28 mm
Median	11,11 mm	12,25 mm
STABW	1,37510	2,18705

Tabelle 8: Statistik der Augmentationshöhe

Nach gepaartem t-Test war Differenz die Augmentationshöhe statistisch nicht signifikant (**p = 0,461**)

Tier	Kontrollseite: Bio-Oss® + PRP	Testseite: Bio-Oss® + PRP + Zellen
1	0,0 %	0,0 %
2	12,7 %	33,0 %
3	6,3 %	5,7 %
4	35,3 %	30,0 %
5	0,0 %	10,4 %
6	15,7 %	11,5 %
Maximum	35,3 %	33,0 %
Minimum	0,0 %	30,0 %
Mittelwert	11,7 %	15,0 %
Median	9,5 %	10,7 %
STABW	13,24306	13,39887

Tabelle 9: Statistik der Knochendichte

Die Differenz der Knochendicht war nach Wilcoxon-Analyse statistisch nicht signifikant (**p = 0,686**)

8. DANKSAGUNG

Herrn Prof. Dr. Dr. J. Wiltfang (Direktor der Klinik für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie Kiel) danke ich für die Bereitstellung der Arbeitsmittel sowie der Arbeitsmöglichkeit in den Laboratorien der Klinik.

Herrn Prof. Dr. Dr. H. Terheyden danke ich für die Überlassung des Themas sowie die Unterstützung bei der Planung und Durchführung der experimentellen Arbeit.

Mein Dank gilt Frau Dr. E. Behrens, die mich tatkräftig bei der Konzeption und Erstellung der Dissertationsschrift unterstützte und mir in allen fachlichen Fragen stets zur Seite stand.

Herrn Dr. Th. Sommer danke ich für die freundschaftliche Hilfsbereitschaft bei der Formatierung der Dissertationsschrift.

Herrn Prof. Dr. Dr. I. Springer danke ich für die Unterstützung bei dem experimentell-operativen Teil der Arbeit.

Frau G. Neßenius, MTA, danke ich für die Hilfe bei der Herstellung der Präparate und der Unterstützung bei den Fotoarbeiten

Für die statistische Beratung danke ich Frau Dr. A. Caliebe

Darüber hinaus bedanke ich mich bei den Mitarbeitern der Bundesforschungsanstalt für Ernährung und Lebensmittel Schaedbek für die Betreuung und Pflege der Tiere und der Geistlich Pharma AG und der DKZMK für die Förderung der Studie.

9. LEBENSLAUF

■ Persönliche Daten

Name:	Johannes Voß
Geburtstag:	25.07.1981
Geburtsort:	Lübeck
Eltern	Dr. Hartwig Voß Sybille Voß (geb. König)
Familienstand:	ledig

■ Schulbildung

1988 – 2001	Besuch der Freien Waldorfschule Frankenthal Abschluss Abitur
-------------	---

■ Zivildienst

2001 – 2002	Malteser Hilfsdienst Frankenthal
-------------	----------------------------------

■ Studium

Oktober 2002	Beginn des Studiums der Zahnmedizin an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel
September 2003	Naturwissenschaftliche Vorprüfung
März 2005	Physikum
Dezember 2007	Staatsexamen mit der Note Sehr gut

■ Tätigkeit

Seit 19.05.2008	Assistenz Zahnarzt in der Kieler Praxis Dr. Krug & Partner
-----------------	--

■ Wissenschaft

Seit September 2005	Promotionsarbeit an der Klinik für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie an der Christian-Albrechts-Universität Kiel
---------------------	---